VOLUMEN 13. 1960 ENERO-MARZO. NUMERO 1

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

S.P.
R.A.M.
M.M.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

1 JUL 1960

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

INDICE

Páginas

Estudios sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos en las bacterias. IV. Influencia de algunos factores sobre la actividad enzimática de filtrados de bacterias en el ácido ribonucleico (ARN), por *Ramona Vaamonde Fernández* y *Benito Regueiro Varela* 1

Estudios sobre el metabolismo enzimático del *Streptomyces griseus*. II. Actividad α-manosidásica, por *Ramón Otero Abalo* y *Benito Regueiro Varela* 15

Ensayos con el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) sobre los virus rábico fijo, poliomielítico, vacunal y encefalítico equino Oeste, *in vitro* e *in vivo*, por *Angel P. García-Gancedo, M.ª Luisa Alonso* y *Eduardo Gallardo* 31

Ensayos con el indol-3-acético sobre los virus rábico fijo, poliomielítico, vacunal y encefalítico equino Oeste, *in vitro* e *in vivo*, por *Angel P. García-Gancedo, M.ª Luisa Alonso* y *Eduardo Gallardo* 49

Nuevo estudio biológico del género *Azotobacter* (descubrimiento de sus formas *L*), por *J. Morales* 59

Bibliografía, por *Miguel Rubio-Huertos* y *Rodrigo Moreno*... 93

Primer Congreso Internacional de Histoquímica y de Citoquímica 100

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO DE LOS ACIDOS NUCLEICOS EN LAS BACTERIAS

IV. Influencia de algunos factores sobre la actividad enzimática de filtrados de bacterias en el ácido ribonucleico (ARN)

POR

RAMONA VAAMONDE FERNANDEZ y BENITO REGUEIRO VARELA

INTRODUCCION

Si se añade una bacteria a un medio de cultivo apto para su desarrollo, éste pasa por una serie de fases que se pueden representar gráficamente como una "curva de crecimiento". Así lo hicieron R. Vaamonde y B. Regueiro (1) con *Escherichia coli* y *Sarcina lutea,* para después determinar, por una modificación original del método de Schmidt y Thannhauser, el contenido de ácidos nucleicos (ARN y ADN) en cada una de las diferentes fases de la curva de crecimiento y establecer relaciones de biosíntesis.

Sabiendo que los componentes celulares de una bacteria se originan a partir de los elementos presentes en el medio de cultivo, R. Vaamonde y B. Regueiro (2), estudian la formación de los ácidos nucleicos del *Escherichia coli* en un medio sintético, para observar la influencia que los componentes del mismo tienen en dicha biosíntesis, demostrando que el magnesio, en el caso del ARN y ADN, y el hierro, en el caso del ARN, juegan un papel fundamental, seguramente por formar parte de la molécula de algunas enzimas que toman parte en la biosíntesis de los citados ácidos nucleicos. Durante las fases de crecimiento de las bacterias, y al tiempo que ocurre la biosíntesis de los ácidos nucleicos, existe una degradación de los mismos por intermedio de una serie de

enzimas hidrolizantes. R. Vaamonde y B. Regueiro (3) estudian estas enzimas en su formación durante las fases de crecimiento, y más adelante (4), la influencia que ejerce la composición de un medio de cultivo sintético en la formación de estas enzimas por el *Escherichia coli.*

Diferentes factores físicos, químicos y biológicos influyen en la actividad de las enzimas anteriores. Los autores tratan de estudiar en este trabajo la influencia del tiempo de acción, de la cantidad de enzima, pH, magnesio y hierro en la actividad de diversos filtrados bacterianos sobre el ácido ribonucleico (ARN); la actividad que se mide es la fosfatasa y la ribonucleasa (RN-asa).

METODOS

Se utilizan en este trabajo cultivos en medio sintético y caldo común del *Escherichia coli,* y sólo en caldo común de la *Sarcina lutea.* Medios y condiciones de crecimiento fueron dados en trabajo anterior (1). Para determinar la actividad enzimática de los filtrados se utiliza la técnica modificada de P. W. Muggleton y M. Webb (5), dada en detalle en trabajo anterior (3) y que, en resumen, consiste en lo siguiente: en un tubo se coloca ribonucleato sódico (substrato) y filtrado de cultivo (enzima) con "buffer" veronal y cloruro sódico; se pone a 37° C. durante dos horas; después de enfriar se precipita el ARN no hidrolizado con reactivo MacFadyen y en el líquido se determina el fósforo inorgánico y total por el método de Fiske y Subbarow (6), y la ribosa por el método de Mejbaum (7). Como testigo se utiliza una mezcla idéntica, pero calentada previamente a 60° C. durante diez minutos para inactivar las enzimas. La diferencia entre las dos determinaciones nos da la actividad enzimática.

RESULTADOS

Utilizando los métodos antes señalados, vamos a determinar la influencia de los factores siguientes:

a) Influencia del tiempo de acción.
b) Influencia de la cantidad de enzima.

c) Influencia del pH.
d) Influencia del magnesio.
e) Influencia del hierro.

En todas las determinaciones se utiliza ácido ribonucleico (Schwarz Inc.) como substrato y filtrado de cultivos en caldo común y medio sintético como enzimas. El medio sintético (glucosa-sulfato amónico-fosfato monopotásico-fosfato dipotásico-sulfato de magnesio-sulfato de hierro) se utiliza completo o sin alguno de los elementos no imprescindibles, que son todos, a excepción de la glucosa y sulfato amónico; según esto, reciben las denominaciones siguientes: a), *medio completo;* b), *medio sin fosfato monopotásico;* c), *medio sin fosfato dipotásico;* d), *medio sin magnesio;* e), *medio sin hierro.* Otras veces se usa como testigo una ribonucleasa comercial pancreática.

En todos los factores estudiados se mide la actividad fosfatásica (determinaciones de fósforo inorgánico) y la actividad ribonucleásica (determinaciones de fósforo total y de ribosa); los resultados se expresan en γ/cm^3 liberadas por la enzima.

a) Influencia del tiempo de acción

En pruebas preliminares se había observado que una RN-asa comercial aumentaba su actividad con el tiempo de contacto con un substrato específico (ARN); interesaba conocer si las enzimas de filtrados bacterianos eran también influídas por el tiempo de contacto con el substrato. En todos los casos utilizamos ribonucleato sódico como substrato y los filtrados indicados anteriormente (en el caso que se indica *coli,* es cultivo de éste en caldo común).

Los resultados obtenidos para *actividad fosfatásica* se indican en la figura 1. En la primera media hora se nota una menor actividad de los filtrados de medio sintético sin fosfatos o sin magnesio, pero a las cuatro horas el máximo de actividad lo alcanzan los filtrados sin magnesio, sin hierro o el caldo común.

Los resultados obtenidos para *actividad ribonucleásica* se indican en la figura 2 en términos de fósforo total liberado, y en la 3, en términos de ARN liberado. Suelen existir diferencias entre ambos resultados.

De acuerdo con el fósforo total, la actividad ribonucleásica aumenta

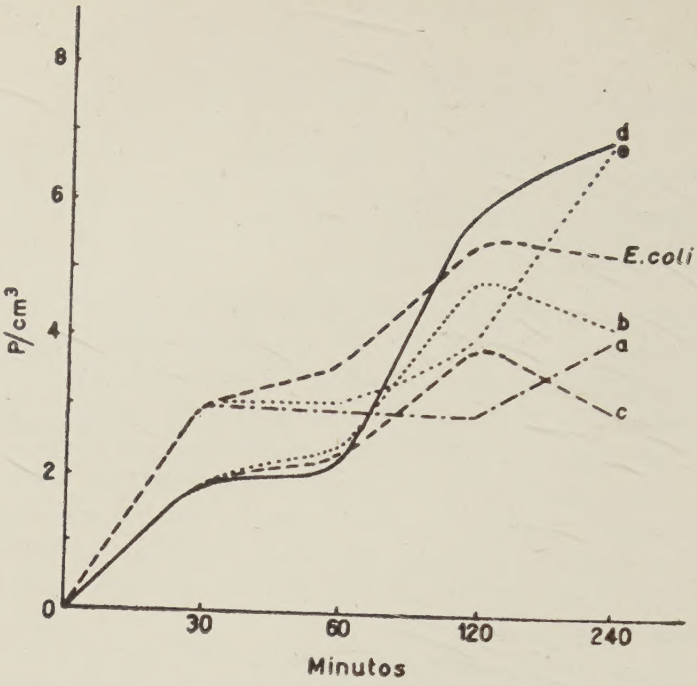


Figura 1

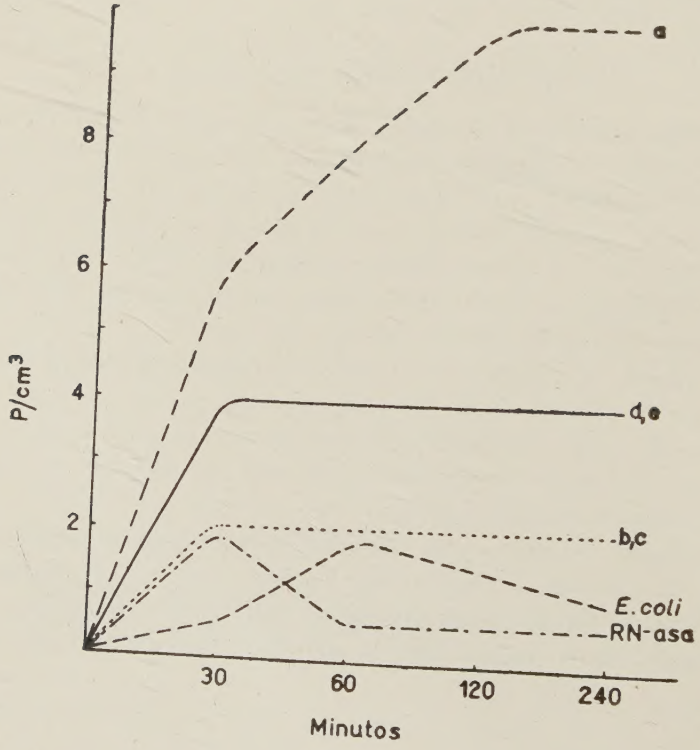


Figura 2

en todos los casos hasta la primera media hora, permaneciendo después estacionaria, a no ser en el caso de filtrados de medio sintético completo que sigue subiendo hasta las dos horas. De acuerdo con el ARN liberado,

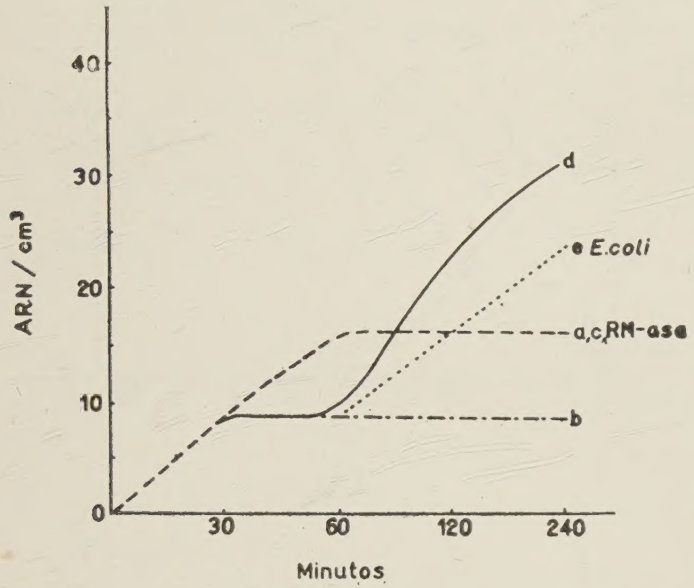


Figura 3

se observa aumento de actividad a partir de la hora, en los casos de filtrados de caldo común y de medio sintético sin magnesio o sin hierro.

b) Influencia de la cantidad de enzima

En pruebas preliminares se había observado que la cantidad de RN-asa comercial influía sobre su acción en el substrato específico; habiéndose en este caso fijado como óptimo 0,006 mg. de enzima para 1,0 mg. de substrato, interesaba conocer la cantidad óptima de filtrado (enzima) que actuaba sobre la misma cantidad de substrato.

Los resultados obtenidos para *actividad fosfatásica* se indican en la figura 4. Como es lógico, cuanta más cantidad de filtrado, mayor actividad se obtiene en todos los casos, a excepción de los filtrados de

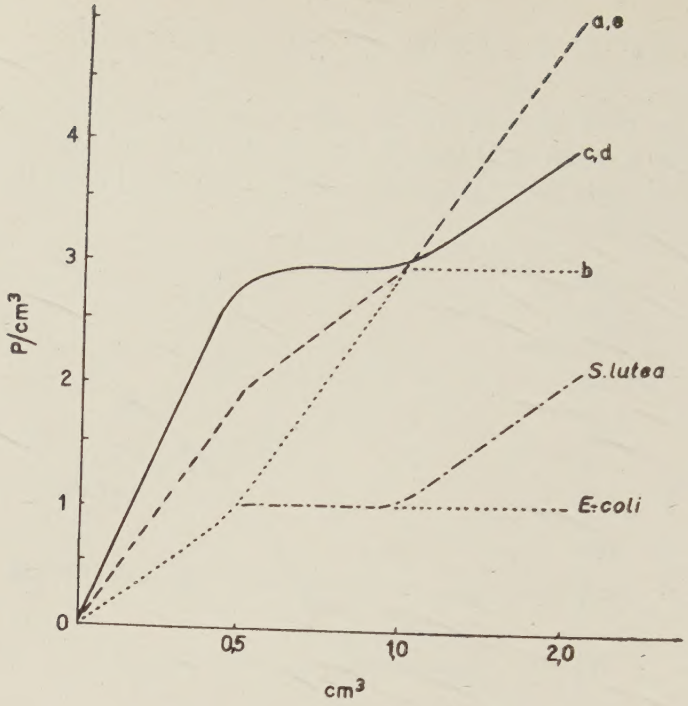


Figura 4

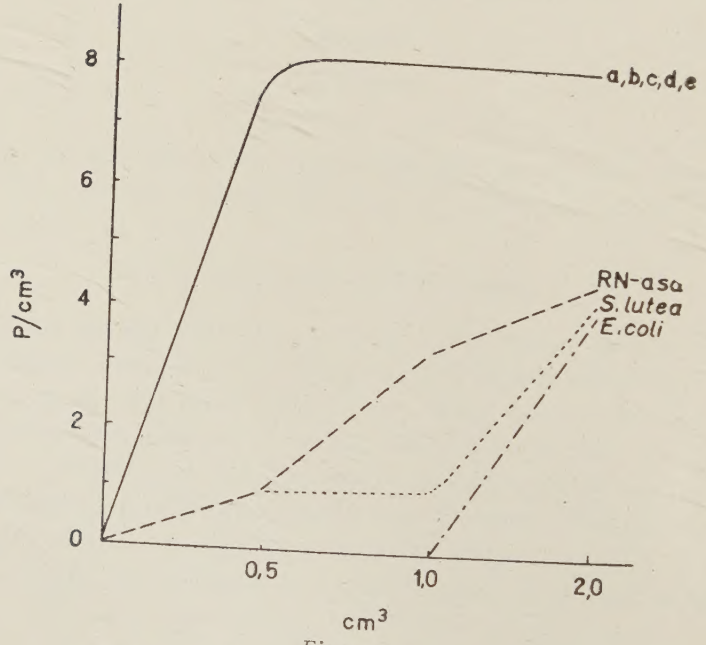


Figura 5

caldo común de *E. coli* y *S. lutea* que, a su vez, dan menos actividad que los filtrados de medios sintéticos.

Los resultados obtenidos para *actividad ribonucleásica* se indican en la figura 5 en términos de fósforo total liberado, y en la 6 en términos de ARN liberado. Existen diferencias entre ambos resultados.

De acuerdo con el fósforo total, la actividad ribonucleásica de todos

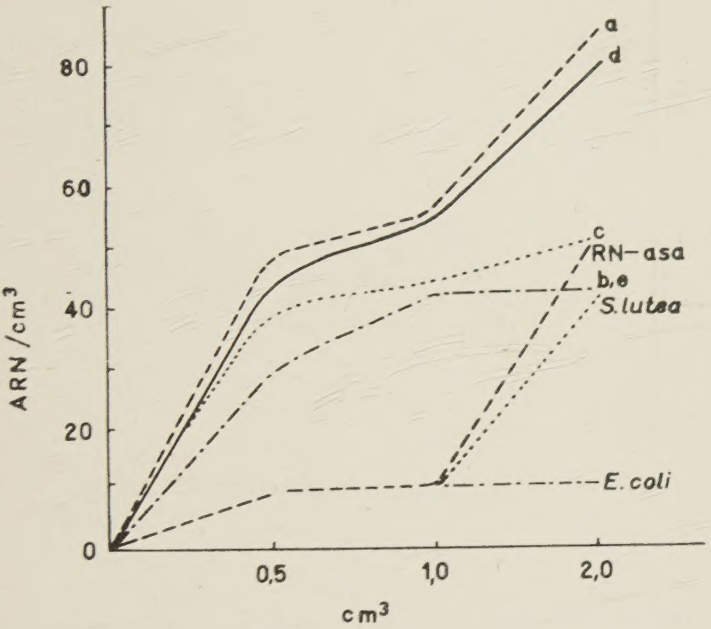


Figura 6

los filtrados de medio sintético es igual, aumentando hasta 0,5 cm³. En cambio, la de los filtrados de caldo común de *E. coli* y *S. lutea*, así como de un testigo de RN-asa comercial, aumenta, a medida que aumenta la cantidad, siendo mucho más bajas que las de medio sintético, sobre todo en el caso de *E. coli*.

De acuerdo con el ARN liberado, se observa aumento en todos los casos a medida que aumenta la cantidad de filtrado (enzima), a excepción del filtrado de caldo común de *E. coli*.

c) Influencia del pH

El pH es uno de los factores más importantes que influyen en la actividad de las enzimas. El pH puede variar durante la reacción enzima-substrato; nosotros lo determinamos al principio y al final de la reacción, no observando diferencias importantes. Utilizamos para el

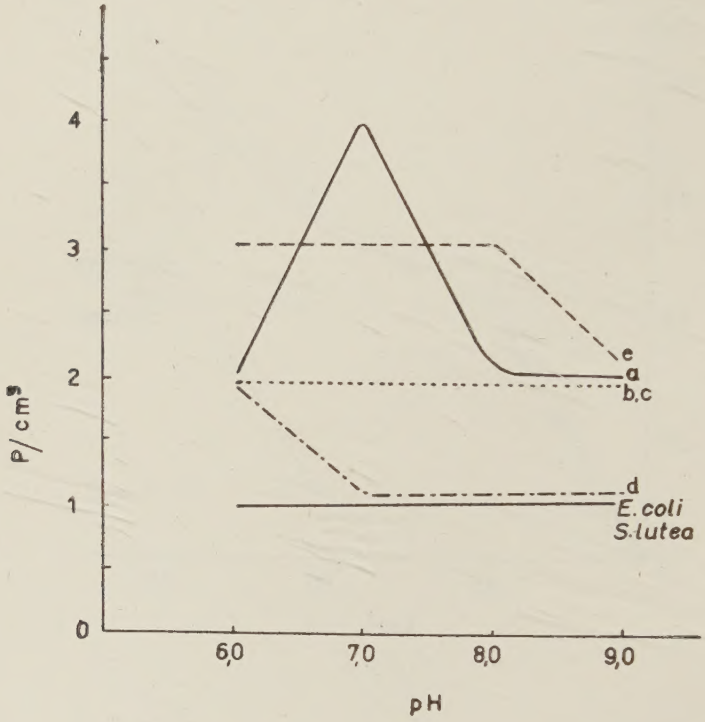


Figura 7

pH 6, un "buffer" de ftalato ácido de potasio M/5 con NaOH M/5 y para los restantes pH, un "buffer" de veronal sódico 0,1M con ClH 0,1M. Los resultados obtenidos para la *actividad fosfatásica* se indican en la figura 7. Se observa que la actividad fosfatásica de los filtrados de caldo común de *E. coli* y *S. lutea* no se afectan por el pH de la reacción, así como los filtrados de medio sintético sin alguno de los fosfatos. La actividad fosfatásica de un filtrado de medio sintético completo del

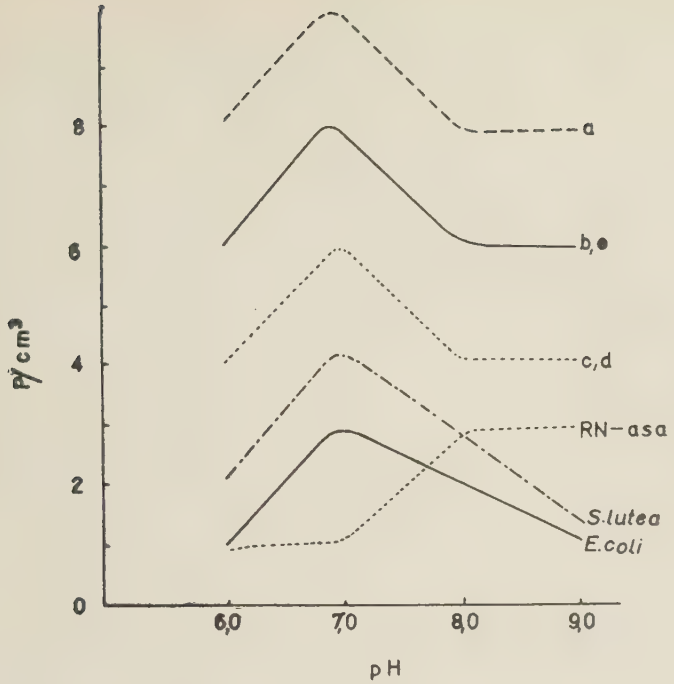


Figura 8

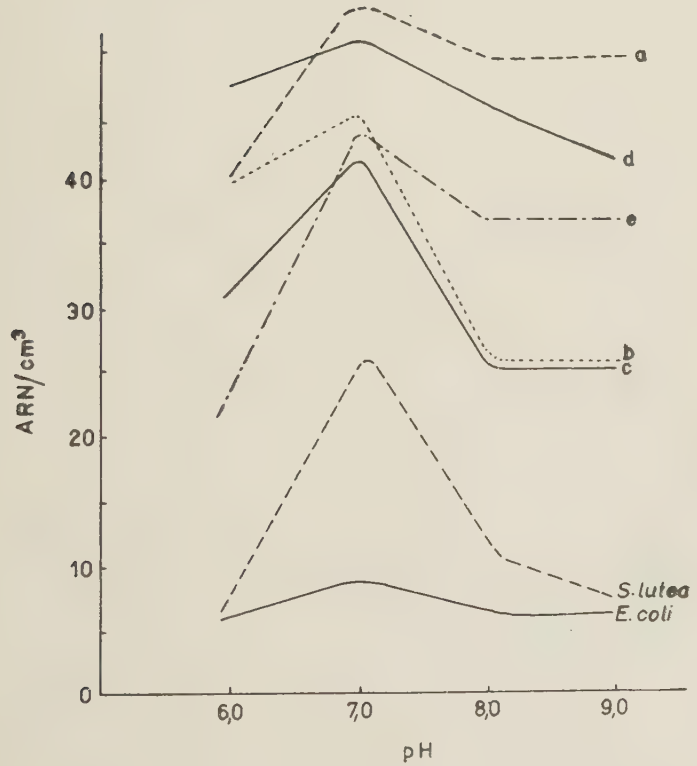


Figura 9

coli tiene un óptimo de actividad a pH 7; el filtrado del medio sin magnesio tiene un óptimo a pH 6 y sin hierro no se afecta entre 6 y 8.

Los resultados obtenidos para *actividad ribonucleásica* se indican en la figura 8 en términos de fósforo total liberado, y en la 9, en términos de ARN liberado. Existen diferencias cuantitativas entre ambos resultados, pero en los dos casos se señala un óptimo de actividad a pH 7.

d) Influencia del ion magnesio

Ciertos iones pueden influir en la reacción enzima-substrato; nos interesa conocer la influencia del magnesio y del hierro por considerarlos importantes en los tipos de actividad enzimática que estudiamos. Se utiliza el método general señalado, pero en este caso se añade a la mezcla enzima-substrato 1 cm^3 de una solución de sulfato de magnesio, que equivale a 700 γ de SO_4Mg.

Los resultados finales de actividad, medidos en γ/cm^3, se recogen en el cuadro 1.

Cuadro 1

Enzima - substrato	a	b	c	d	e	*E. coli*	*S. lutea*	RN-asa
P inor.: fosfatasa (sin Mg) ...	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	1,0	1,0	
P inor.: fosfatasa (con Mg.) ...	2,0	4,0	2,0	3,0	4,0	1,0	1,0	
P total: RN-asa (sin Mg.) ...	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	0,0	1,0	3,0
P total: RN-asa (con Mg.) ...	8,0	8,0	10,0	10,0	10,0	1,0	1,0	
ARN, %: RN-asa (sin Mg.) ...	56,0	40,0	40,0	52,0	40,0	8,0	8,0	8,0
ARN, %: RN-asa (con Mg.)...	96,0	84,0	88,0	84,0	92,0	16,0	12,0	8,0

En los resultados obtenidos para medir la *actividad fosfatásica* son tan ligeras las variaciones señaladas que puede afirmarse que el magnesio no toma parte en la reacción enzima-substrato.

En cuanto a los resultados que se obtienen y que expresan la *actividad ribonucleásica* en fósforo total liberado, no se señalan diferencias que estén fuera del error de la determinación; en cambio, sí hay diferencias cuando los resultados se expresan en ARN liberado. Se observa un aumento general de actividad en todos los casos de filtrados, pero no cuando se trata de RN-asa comercial.

e) Influencia del ion hierro

Las consideraciones que se hacían para el magnesio pueden aplicarse para el hierro. Se utilizan los mismos métodos y se añade a la mezcla substrato-enzima 1 cm^3 de una solución de sulfato de hierro, que equivale a 30 γ de SO_4Fe.

Los resultados finales de actividad medidos en γ/cm^3 son los recogigos en el cuadro 2.

Cuadro 2

Enzima - substrato	a	b	c	d	e	*E. coli*	*S. lutea*	RN-asa
P inor.: fosfatasa (sin Fe)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	1,0	1,0	
P inor.: fosfatasa (con Fe)... ...	2,0	3,0	2,0	2,0	3,0	1,0	1,0	
P total: RN-asa (sin Fe)... ...	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	0,0	1,0	3,0
P total: RN-asa (con Fe)	6,0	8,0	12,0	12,0	8,0	1,0	4,0	2,0
ARN, %: RN-asa (con Fe) ...	56,0	40,0	40,0	52,0	40,0	8,0	8,0	8,0
ARN, %: RN-asa (con Fe) ...	60,0	56,0	56,0	28,0	60,0	16,0	16,0	20,0

De los resultados obtenidos para medir la *actividad fosfatásica* se deduce que las variaciones son tan ligeras que puede afirmarse que el hierro no toma parte en esta reacción de enzima-substrato.

En cuanto a los resultados obtenidos para medir la *actividad ribonucleásica* en fósforo total liberado, la diferencia más importante aparece en el caso de la RN-asa de *S. lutea* en caldo común, en el que aumenta la actividad. En los resultados que se expresan en ARN liberado, hay un aumento general de actividad en todos los casos y aun en la actividad de una RN-asa comercial.

DISCUSION

Tanto en la biosíntesis como en la degradación del ácido ribonucleico (ARN) intervienen una serie de enzimas que actúan sobre diferentes fases de dichos procesos. Nosotros estamos interesados en aquellos que dan lugar a la degradación o hidrólisis del ARN. Específicamente nos referimos a la ribonucleasa (RN-asa), que hidroliza el polinucleótido

a mononucleótidos, y la fosfatasa, que pasa los mononucleótidos a mononucleósidos.

Los componentes celulares de una bacteria se forman a partir de elementos presentes en el medio de cultivo. Este principio general puede aplicarse a la biosíntesis de los ácidos nucleicos, así como a las enzimas específicas de un metabolismo de degradación. En todo metabolismo se desarrolla una serie de reacciones en cadena que dan lugar a determinados productos. Cualquier variación original o durante el transcurso de su desarrollo puede dar lugar a cambios en la naturaleza de los productos finales. Variaciones originales pueden realizarse suprimiendo determinadas sustancias en un medio de cultivo sintético y pueden producirse cambios haciendo intervenir determinados factores físicos, químicos o biológicos.

M. Holden y N. W. Pirie (8) encuentran diferencias en la actividad de una RN-asa pancreática y otra obtenida de hojas vegetales, observando variaciones en el efecto de agentes inhibidores, pH óptimo y termoestabilidad.

Nosotros tratamos de ver si RN-asas formadas en el cultivo de bacterias difieren en su actividad, según cambia la composición del medio de cultivo, y si esta actividad es afectada por algunos factores, cualitativa y cuantitativamente.

Los factores que se estudian son: el tiempo de acción del filtrado sobre el substrato (ARN), la cantidad de filtrado que actúa, el pH, magnesio y hierro.

Actividad fosfatásica. Se utiliza como substrato el ARN, sobre el que actúa la enzima o filtrado, separando fosfato inorgánico. En filtrados de *E. coli* en medio sintético sin magnesio o hierro y en caldo común, se obtiene el máximo de actividad a las cuatro horas. Cuanta más cantidad de filtrado se pone, mayor actividad de enzima se obtiene en todos los casos, a excepción de los filtrados de caldo común de *E. coli* y *S. lutea* que, a su vez, dan menos actividad que los filtrados de medios sintéticos. Estos últimos filtrados no se afectan por el pH a que se desarrolla la reacción, lo cual también le ocurre a los filtrados procedentes del crecimiento en medio sintético del *E. coli* sin fosfato mono o dipotásico. El filtrado procedente de medio sintético completo tiene un pH óptimo de actividad a 7; el que carece de magnesio, a 6, y el que no tiene hierro, entre 6 y 8.

La actividad fosfatásica de todos los medios probados no se afecta por la presencia de magnesio o de hierro, pudiendo, pues, afirmarse que estos dos metales no son activadores ni inhibidores de la reacción.

Actividad ribonucleásica. Aunque en la parte de resultados hemos visto la actividad ribonucleásica por los métodos de determinación, nos parecen mucho más reales los resultados obtenidos por determinación de ribosa (ARN, %) por ser reacción mucho más específica. Según esto, se nota un aumento de actividad a partir de una hora de contacto de enzima y substrato, para los casos de filtrados procedentes de caldo común o de medio sintético sin magnesio o hierro. En todos los casos se observa aumento de actividad de enzima, a medida que aumenta la cantidad de filtrado, a excepción del filtrado de caldo común de *E. coli*. En todos los casos, el óptimo de actividad enzimática se encuentra a pH 7,0.

El magnesio y el hierro presentes en la mezcla enzima-substrato tienden a aumentar la actividad enzimática en todos los casos, a excepción del magnesio con una RN-asa comercial.

De todo esto se deduce que en presencia de un mismo substrato, existen diferencias en las enzimas fosfatasa y RN-asa formadas en diferentes medios de cultivo (natural y sintético) para *E. coli* y *S. lutea*. Estas diferencias se aprecian estudiando la influencia de algunos factores, como: tiempo de acción, cantidad de enzima, pH, magnesio y hierro.

RESUMEN

Se estudian las actividades fosfatásica y ribonucleásica de filtrados de *Escherichia coli* en caldo común y medios sintéticos y de *Sarcina lutea* en caldo común, sobre ácido ribonucleico (ARN) como substrato. Se observan diferencias cualitativas y cuantitativas de actividad enzimática cuando se estudia la influencia de algunos factores, como: tiempo de acción, cantidad de enzima, pH, magnesio y hierro. Con esto se demuestra que la composición del medio de cultivo afecta a la especificidad de las enzimas de que se trata.

SUMMARY

Phosphatase and ribonuclease activities of *Escherichia coli* filtrates in broth and synthetic media and these of *Sarcina lutea* filtrates in broth, using RNA as substratum, have been studied. Qualitative and quantitative differences in enzymatic activity due to the influence of some factors, such as acting time, enzyme quantity, ph, magnesium and iron, were observed. This shows that the composition of the culture media influences enzyme specificity.

BIBLIOGRAFIA

1. Vaamonde, R., y Regueiro, B. 1957. Microbiol. Espań., 10, 461.
2. Vaamonde, R., y Regueiro, B. 1953. Microbiol. Espań., 11, 77
3. Vaamonde, R., y Regueiro, B. 1958. Microbiol. Espań., 11, 207
4. Vaamonde, R., y Regueiro, B. 1958. R. esp. Fisiol., 14, 215.
5. Muggleton, P. W., y Weeb, M. 1952. Biochem. Biophys. Acta, 8, 343.
6. Fiske, C. H., y Subbarrow. 1925. J. Biol. Chem., 66, 375.
7. Mejbaum, W. 1959. Z. phisiol. Chem., 258, 117.
8. Holden, M., y Pirie, N. W. 1955. Biochem. J., 60, 53.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO ENZIMATICO DEL *STREPTOMYCES GRISEUS*

II. Actividad α-manosidásica

POR
RAMÓN OTERO ABALO y BENITO REGUEIRO VARELA

INTRODUCCION

Otero y Regueiro (1) iniciaban en un trabajo anterior el estudio del metabolismo enzimático del *Streptomyces griseus,* productor de la estreptomicina, para demostrar la relación existente entre la nutrición del microorganismo y la producción de enzimas.

Sabemos que la formación de estreptomicina por el *Streptomyces griseus* es consecuencia de un proceso metabólico, en el que intervienen determinadas enzimas. Estas pueden ser influídas por una gran variedad de factores, que, en consecuencia, afectan a su vez al metabolismo de producción del antibiótico.

Entre los factores que afectan a la actividad enzimática, tenemos: la concentración de la enzima, pues existe una relación enzima/substrato, que suele ser óptima para cada tipo de enzima. También existe un pH óptimo para cada enzima, que debe de estudiarse. Por último, nos interesa investigar la influencia que algunos iones metálicos juegan en estos procesos metabólicos, bien por inactivación, bien por activación de las reacciones enzimáticas.

En el trabajo anterior se estudió la actividad α-glucosidásica del *Streptomyces griseus;* aquí vamos a estudiar la α-manosidásica, que consideramos de gran importancia en el metabolismo de formación de la estreptomicina.

Formación de antibióticos por el Streptomyces griseus.

Schatz, Bugie y Waksman (2), de un caldo del cultivo del *St. griseus,* aislan una sustancia activa, sobre todo, contra gérmenes Gram-negativos, a la que llamaron estreptomicina. Se trata de un compuesto básico, soluble en agua y que por acción de los ácidos da dos compuestos: estreptidina y estreptobiosamina. Por hidrólisis alcalina, la estreptomicina produce un derivado, que se llama maltol, el cual se utiliza para su determinación química, al dar un color violeta en presencia de cloruro férrico, como realizaron Schenk y Spielman (3).

Titus y Friend (4) encuentran que preparaciones impuras de estreptomicina contienen otra sustancia, que, purificada y analizada, resultó ser una manósido-estreptomicina o estreptomicina B. Los investigadores de Squibb demuestran que ésta es la estreptomicina natural que se produce al principio de la fermentación, pero que a medida que se desarrolla se va convirtiendo en estreptomicina activa, por acción enzimática.

α-*manosidasa de microorganismos*

La enzima capaz de convertir la manósido-estreptomicina en manosa y estreptomicina se denomina α-manosidasa, y pertenece al grupo general de las glucosidasas. Es una enzima de tipo adaptativo, es decir, que se forma como respuesta a la presencia en el medio de un substrato específico. Al ser de tipo hidrolítico, su biosíntesis consume energía, por lo que venenos respiratorios inhiben su producción.

La acción manosidásica fué observada por primera vez, en relación con la producción de estreptomicina, por Langlykke y Perlman (5), viendo que un cultivo viejo de *St. griseus* pasaba la manósido-estreptomicina a estreptomicina cuando se añadía a un cultivo joven.

Quizá el trabajo más interesante realizado sobre esta enzima es el de Hockenhull y sus colaboradores (6), de los laboratorios Glaxo, de Inglaterra, en sus estudios sobre el metabolismo de los *Actynomices.* La actividad enzimática la miden por la intensidad de hidrólisis que produce la enzima sobre α-fenil-D-manósido. La liberación del fenol de este compuesto se mide más fácilmente que la de la estreptomicina de la manósido-estreptomicina, teniendo en cuenta que los resultados en ambos casos son correlativos.

Los autores anteriores encuentran que algunos azúcares, como: maltosa, celobiosa, manosa y metil-manosa, tienen efecto inhibidor de la enzima; también el cobre y el hierro reducen su actividad; el magnesio y el calcio no tienen efecto alguno sobre la enzima.

Como decíamos al principio, esta enzima debe ser de tipo adaptativo; Perlman y Langlykke (7) han aislado manosa del medio de estreptomicina, y piensan que este azúcar debe ser una reserva del *St. griseus*, que se libera cuando se acaba la glucosa del medio.

Es de interés conocer los factores que favorecen la formación de esta enzima y, por lo tanto, la producción de estreptomicina. Nosotros los reducimos a los siguientes:

a) Activación de los mecanismos de formación de la manosidasa.
b) Inhibición del metabolismo formador de la estrepto-manosidasa.
c) Disminución de la cantidad de azúcar.
d) Presencia de sustancias orgánicas complejas.
e) Cultivos viejos de *St. griseus*.
f) pH, aireación y temperatura apropiada.
g) Compuestos activadores, como arseniato (veneno respiratorio).

METODOS

Los detalles de los métodos seguidos en este trabajo pueden revisarse en el anterior de Otero y Regueiro (1), en cuanto a la conservación, esporulación y fermentación del *Streptomyces griseus* en medios natural y sintético, cuyas fórmulas son también allí reseñadas.

Para la determinación de la actividad α-manosidásica se utilizan como fuentes de enzima, micelios y filtrados de los caldos de fermentación. El micelio se lava varias veces y deseca después por adición de acetona y éter fríos, evaporándose a continuación en desecador de vacío con silica-gel. El polvo de micelio obtenido sirve de fuente de enzima.

Para determinar la actividad α-manosidásica se utiliza la técnica modificada de Hockenhull y colaboradores (6), que se funda en la determinacion de fenol liberado por la enzima por el método de Gottlied y Marsch (8); dicho fenol, en presencia de 4-aminoantipirina, da color que puede medirse. Como substrato de enzima utilizamos el α-fenil-D-manósido, preparado por el Prof. Ribas en el laboratorio de Química Orgá-

nica de la Facultad de Ciencias, de Santiago de Compostela, a quien agradecemos su valiosa ayuda.

Como enzima se utilizan 100 mg. de micelio desecado ó 5 cm^3 de filtrado. Se añade fosfato "buffer" (pH : 7,6) y α-fenil-D-manósido en unos matraces especiales descritos en el trabajo anterior. Se ponen en agitación, y a las cinco horas se añade etanol, filtra la mezcla y determina el fenol liberado en una cantidad dada de muestra. A ésta se le añade "buffer" glicocola, solución de ferricianuro potásico y solución de 4-amino-antipirina; se produce una coloración, que se mide en fotocolorímetro Kipp (filtro 55), comparando con una curva patrón de fenol.

RESULTADOS

En el trabajo presente los autores estudian el metabolismo general del *Streptomyces griseus* en medio natural y en medio sintético, y lo relacionan con la producción de α-manosidasa. A continuación se dan los resultados de las experiencias realizadas sobre dicha actividad enzimática y factores que en ella influyen.

a) *Actividad α-manosidásica exo e intracelular del* St. griseus

Esta actividad se expresa, en general, en la diferencia de fenol liberado por una muestra activa y otra inactiva por el calor a 100° C. durante quince minutos. Como ninguna muestra inactiva da liberación de fenol, los resultados se expresan por el fenol total liberado por la muestra activa.

En la figura 1 se expresa la actividad α-manosidásica intracelular (micelio) del *St. griseus,* crecido en medio natural y en medio sintético, a diferentes horas de crecimiento. En los dos casos se observa una rápida subida de actividad a partir de las sesenta horas, y que dura hasta las noventa y seis horas. En el medio natural se mantiene este nivel, pero en el medio sintético se inactiva enzima a partir de la última hora señalada.

Se investiga también la actividad α-manosidásica exocelular en medio sintético. Los resultados expresados en gammas de fenol total liberado por la acción enzimática, en el cuadro 1.

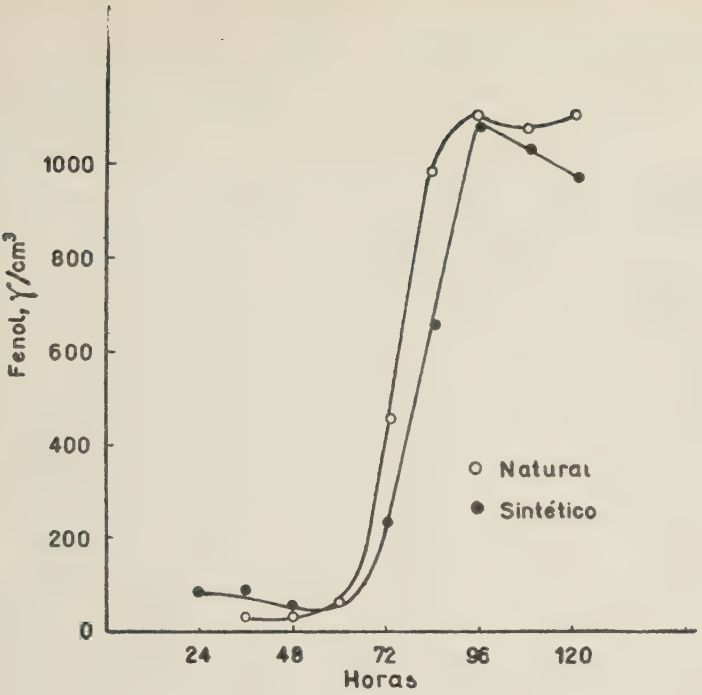


Figura 1

Cuadro 1

Horas	24	48	72	96	120	144	168
Actividad			90	90	90	150	195

La enzima se empieza a producir a partir de las cuarenta y ochosetenta y dos horas, subiendo rápidamente a partir de las ciento veinte horas hasta el final de la fermentación. Se encuentra, pues, una correlación entre la enzima exo y endocelular, en cuanto a su producción, aunque en cuanto a la cantidad es mucho mayor la intracelular. A partir de las noventa y seis horas, la α-manosidasa intracelular se destruye o baja, mientras que la exocelular aumenta, quizá, como consecuencia de autolisis o excreción.

b) Influencia de la relación enzima/substrato en la actividad α-manosidásica

Determinamos la llamada constante de Michaelis, es decir, la cantidad de substrato necesaria para que la enzima dé más del 50 por 100 de su actividad. Experimentalmente, se hace con micelio desecado de

ochenta y cuatro horas de edad (medio natural) y de ciento ocho horas (medio sintético), que poseen una gran actividad α-manosidásica. Los resultados obtenidos se recogen en el cuadro 2.

Cuadro 2

Substrato	Fenol teórico	Medio natural		Medio sintético	
		Fenol total	Porcentaje	Fenol total	Porcentaje
250	91	153	100,0	153	100,0
1250	455	510	100,0	480	100,0
2500	910	780	85,7	720	79,1
6250	2275	975	43,0	660	29,0
12500	4550	915	20,1	615	13,5

Estos resultados se expresan gráficamente en la figura 2, de la que se desprende que la constante de Michaelis corresponde a una cantidad de

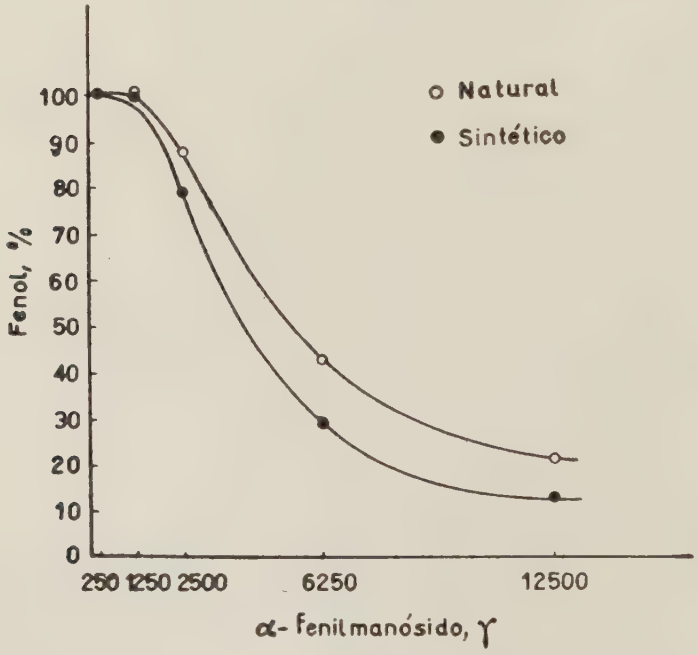


Figura 2

substrato de 6,0 mg. en el caso de la enzima del medio natural y de 4,0 mg. en el caso de la enzima del medio sintético.

c) Influencia del pH en la actividad α-manosidásica

Existe un pH óptimo para cada enzima; interesa aquí conocer el que corresponde a la α-manosidasa intracelular del *St. griseus,* crecido

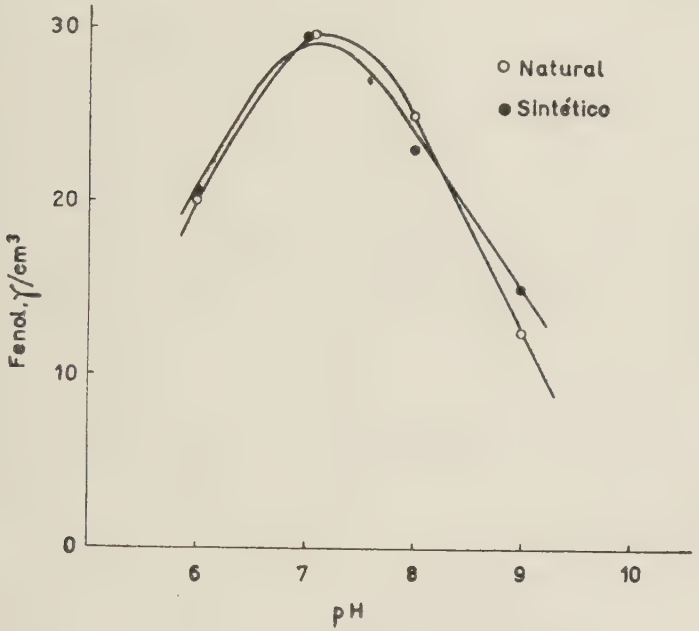


Figura 3

en medio natural o sintético. Se preparan soluciones "buffer" de fosfato para los pH de 6,0, 7,0 y 8,0 y de "buffer" de glicocola para pH de 9,0. Los resultados obtenidos se expresan en la figura 3.

Observamos que el pH óptimo para α-manosidasa es de 7,0 en los dos casos, disminuyendo rápidamente la actividad por debajo y por encima de 6,5 y 7,5. La actividad es casi igual en los dos casos.

d) Influencia de los iones metálicos en la actividad α-manosidásica

Los iones metálicos influyen en la actividad enzimática, inhibiendo o activando dicha actividad. Interesa conocer la acción de los que intervienen en la actividad α-manosidásica y que incluyen magnesio, hierro, zinc y manganeso.

Se sigue el método general de determinación de actividad enzimática, con la sola diferencia de adicionar cantidades variables de los anteriores iones metálicos en forma de sulfatos (1 cm^3). Como en casos anteriores, los testigos de enzima inactivada no dan liberación de fenol. Los resultados se dan en las figuras 4-7.

En dichas figuras se observa que el *magnesio* no influye en la actividad de la α-manosidasa procedente de micelio crecido en medio sintético; en cambio, en la procedente de medio natural, disminuye la actividad enzimática a partir de una concentración 1×10^{-2} M en un 20 por 100.

La influencia del *hierro* es equivalente en la α-manosidasa procedente de micelios de medio natural y sintético. A partir de una concentratración de 1×10^{-3} M, baja la actividad enzimática, siendo ésta nula cuando la concentración se hace 1 M.

El *zinc* también influye en la actividad enzimática de los dos tipos de micelios procedentes de medio natural y de medio sintético, a partir de la concentración de 1×10^{-3} M, siendo dicha actividad nula a la concentración 1 M.

También influye el *manganeso* en la actividad enzimática de los micelios de medios natural y sintético, a partir de la concentración de 1×10^{-1} M, disminuyendo dicha actividad en un 50 por 100 en la manosidasa de medio sintético, y en un 25 por 100 en la de medio natural, cuando la concentración se hace 1 M.

Observando las gráficas y las cifras obtenidas en las experiencias anteriores se deduce que las concentraciones mínimas de iones metálicos que actúan sobre la actividad α-manosidásica son las representadas en el cuadro 3

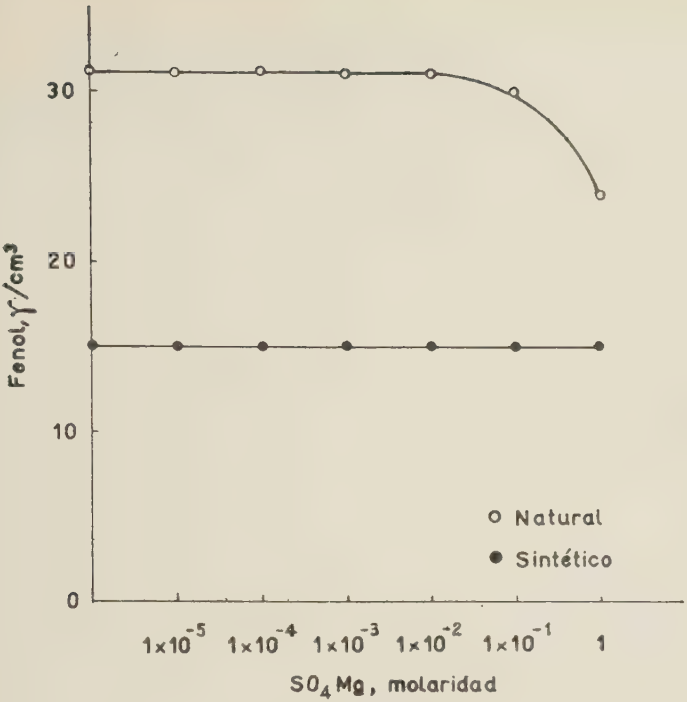


Figura 4

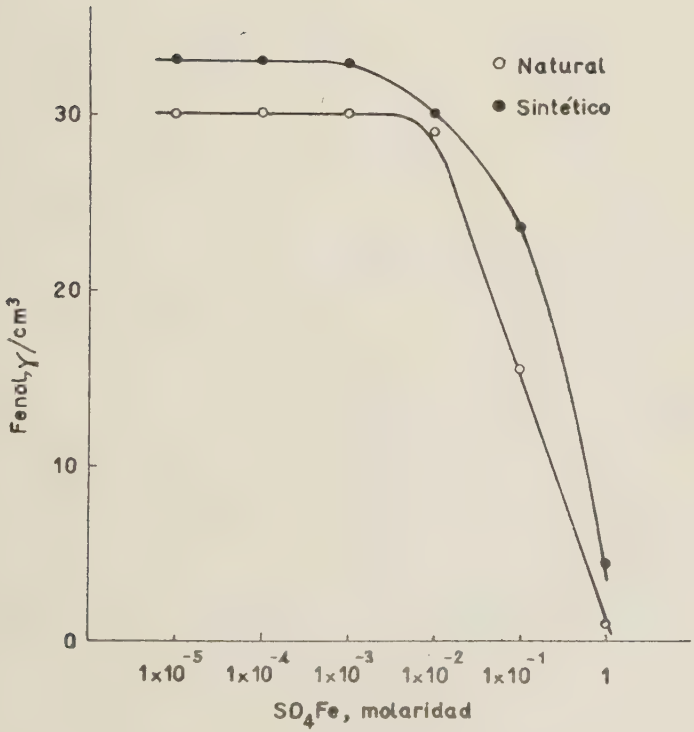


Figura 5

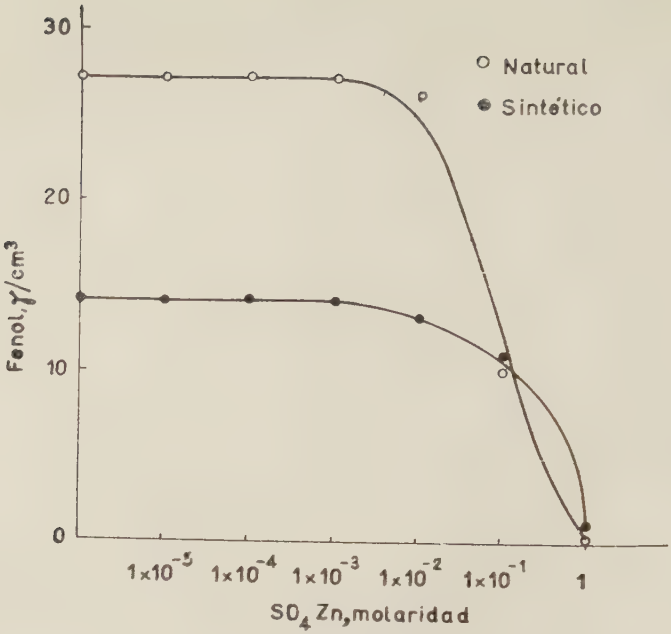


Figura 6

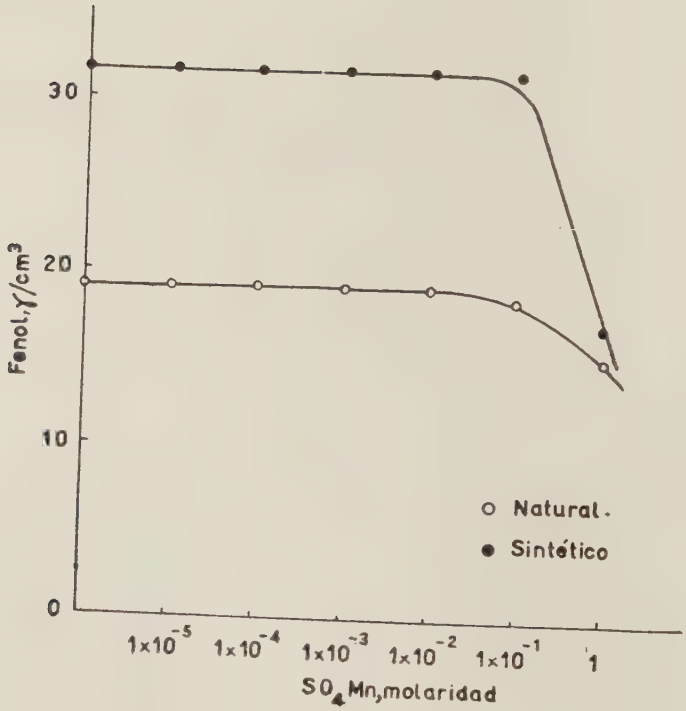


Figura 7

Cuadro 3

Ion	Micelio (m. natural)	Micelio (m. sintético)
Magnesio	1×10^{-2} M	
Hierro	1×10^{-2} M	1×10^{-3} M
Zinc...	1×10^{-3} M	1×10^{-3} M
Manganeso	1×10^{-1} M	1×10^{-1} M

En todos los casos anteriores se ha trabajado con micelios desecados de *St. griseus,* de veinticuatro horas (medio natural) y doce horas (medio sintético). En general, se observa que, al igual que en el caso de la α-glucosidásica, el zinc es el metal que más influye en la actividad α-manosidásica, aunque en este caso algo menos, y también, aunque en menor proporción, el hierro, en el caso de enzima de medio sintético.

e) Influencia de los componentes del medio sintético en la actividad α-manosidásica

Esta parte experimental hay que realizarla con los componentes del medio que permiten crecimiento del micelio para poder utilizar éste como fuente de enzima. Se utiliza micelio desecado y filtrado del medio, después de doce días de fermentación, y los resultados en gammas de fenol liberado se recogen en el cuadro 4.

Cuadro 4

Medio	Filtrado	Micelio
Normal		17,0
N - mitad de nitrato sódico	3,5	13,0
N - nitrato sódico		15,5
N - mitad de "corn steep"...		21,5
N - "corn steep"...	6,0	23,5
N - mitad de magnesio		13,0
N - mitad de hierro...	16,0	29,5
N - mitad de manganeso	24,0	30,0

Se observa que, en general, la actividad enzimática se encuentra al final de la fermentación en el micelio y que la disminución del "corn steep" del hierro y del manganeso aumentan su cantidad. También la disminución de hierro y manganeso hace aumentar la actividad enzimática en el filtrado.

Por el contrario, la disminución de nitrato sódico o de magnesio hace disminuir la actividad enzimática del micelio.

f) Influencia de los componentes del medio sintético en la actividad α-manosidásica sobre manósido-estreptomicina

En esta experiencia se trata de ver qué influencia tienen los componentes del medio de cultivo en la acción de una α-manosidasa (micelio de medio sintético) sobre un substrato de manósido-estreptomicina (se utiliza una estreptomicina con 672 U./mg. y con un 17 por 100 de manósido-estreptomicina). Se realiza por la técnica usual, pero al final se valora la estreptomicina B por el método dado por Grove y Randall (9), aplicado a caldos de fermentación.

Los resultados obtenidos son los recogidos en el cuadro 5.

Cuadro 5

Medio	Estreptomicina U./cm^3	Estreptomicina U./cm^3	Estreptomicina B Porcentaje
Normal	654	318	11,08
N - mitad de nitrato sódico...	601	242	15,42
N - nitrato sódico	601	242	15,42
N - mitad de "corn steep"	654	318	11,08
N - "corn steep"	654	359	9,84
N - mitad de magnesio...	636	359	9,84
N - magnesio...	636	359	9,84
N - mitad de hierro	636	359	9,84
N - hierro...	636	359	9,84
N - mitad de zinc	636	359	9,84
N - zinc	636	359	9,84
N - mitad de manganeso	636	359	9,84
N - manganeso	636	359	9,84
Normal (enzima inact.)	636	359	16,10

Interesan las potencias primeras que corresponden a la potencia total y el porcentaje de manósido-estreptomicina. Se observa que la potencia total en estreptomicina disminuye en el caso de que en el medio falte o disminuya el nitrato sódico. Los demás están dentro del error del método.

En cuanto al contenido en manósido-estreptomicina, se observa la influencia de todos los iones metálicos y del "corn steep" que, al disminuir o faltar, aumentan la actividad enzimática, y, por lo tanto, aumenta la hidrólisis de manósido-estreptomicina.

DISCUSION

En la sistemática general de estos trabajos orientados a demostrar la relación entre la nutrición del *Streptomyces griseus* y la producción de antibióticos, sabemos que la biosíntesis de enzimas está relacionada con ambos extremos.

En trabajo anterior se ha estudiado la actividad α-glucosidásica de los cultivos; en el presente trabajo se estudia la actividad α-manosidásica, cuyo contenido, como el anterior, varía con el crecimiento del *St. griseus* en medio natural y sintético.

Estudiamos las enzimas que se encuentran en el medio filtrado (exoenzimas) y las que se encuentran en el micelio (endoenzimas). Determinadas a diferentes edades, se puede deducir el proceso de su formación, cuando además se introducen variables en el medio de crecimiento.

En los medios naturales, la α-manosidasa intracelular empieza a formarse a partir de las sesenta horas, quizá debido a respuesta de la formación de manósido-estreptomicina, manteniéndose al mismo nivel a partir de las noventa y seis horas; parece que esto es correlativo al consumo de la glucosa. En medios sintéticos, la α-manosidasa intracelular sigue la misma marcha que en el caso anterior, pero al final hay destrucción de la misma, quizá debido a alteraciones del metabolismo nitrogenado.

En cuanto a la producción de la α-manosidasa exocelular, se estudia la producida en medio sintético, observándose existe en muy pequeña proporción si se compara con la intracelular, lo cual parece indicar la naturaleza de la enzima.

La α-manosidasa, enzima muy importante en la biosíntesis de la estreptomicina, puede ser afectada en su formación o degradación por una serie de factores, alguno de los cuales estudiamos en este lugar.

La constante de Michaelis para la manosidasa corresponde a 6,0 mg. de substrato para el caso de la enzima intracelular de micelio desarrollado en medio natural, y a 4,0 mg. para el caso del desarrollado en medio sintético.

Todas las enzimas tienen un óptimo de actividad a un determinado pH; el de la α-manosidasa intracelular de micelio desarrollado en medio natural y medio sintético corresponde a 7,0, es decir, un pH aproximadamente neutro.

La presencia de iones metálicos influye en la actividad enzimática, en general. Su efecto es activar o inhibir la acción de la enzima sobre el substrato. Por otro lado, dichos iones metálicos son necesarios para el crecimiento y la producción de estreptomicina. Los metales más importantes en todos estos casos son: magnesio, hierro, zinc y manganeso.

Las concentraciones mínimas a las que actúan los metales mencionados sobre la actividad α-manosidásica intracelular de micelios crecidos en medios natural y sintético, son las siguientes: 1×10^{-2} M para el magnesio, 1×10^{-3} M para el hierro, 1×10^{-3} M para el zinc y 1×10^{-1} M para el manganeso. Como vemos, el hierro y el zinc son los metales que influyen a más baja concentración; es decir, son los que presentan una mayor actividad.

A partir de las concentraciones anteriores, el magnesio disminuye la actividad enzimática en un 50 por 100; el hierro, en un 100 por 100; el zinc, en un 100 por 100, y el manganeso, en un 50 por 100. Esto corrobora los trabajos de otros autores, que encontraron también alguna de estas acciones.

Observando la relación entre los componentes del medio de cultivo sintético y la actividad α-manosidásica, se observa que la disminución de hierro, manganeso o "corn steep" aumenta la cantidad de enzima intracelular y exocelular, sobre todo en el caso del manganeso. Efecto contrario hace la disminución del nitrato sódico o del magnesio.

También se estudia la influencia de los componentes del medio sintético sobre la actividad α-manosidásica, pero actuando sobre el substrato natural (manósido-estreptomicina), en vez del usado en todo este trabajo (fenil-manósido). Como fuente de enzima usamos micelio de medio natural, observándose que al disminuir o faltar los metales o el "corn steep", aumenta la hidrólisis de la manósido-estreptomicina, es decir, aumenta la actividad α-manosidásica, lo cual se corresponde con la experiencia anterior.

CONCLUSIONES

1.ª En el micelio del *St. griseus* se forma α-manosidasa cuando crece en medio natural o sintético, a partir de las sesenta horas hasta las noventa y seis horas, permaneciendo constante en los micelios crecidos en medio natural y disminuyendo en los crecidos en medio sintético.

2.ª La constante de Michaelis para la α-manosidasa del micelio del *St. griseus* corresponde a 6,0 mg. de substrato cuando ha crecido en medio natural, y a 4,0 mg. cuando ha crecido en medio sintético.

3.ª El pH óptimo de actividad α-manosidásica de micelio de *St. griseus* crecido en medio natural o sintético es de 7,0.

4.ª Las concentraciones mínimas a las que actúan algunos metales sobre la α-manosidasa del micelio de *St. griseus* crecido en medio natural o sintético, son las siguientes: 1×10^{-2} M para el magnesio, 1×10^{-3} M para el hierro, 1×10^{-3} M para el zinc y 1×10^{-1} M para el manganeso. A partir de estas concentraciones, el magnesio y el manganeso disminuyen la actividad en un 50 por 100 y el hierro y el zinc en un 100 por 100.

5.ª La actividad de la α-manosidasa del micelio de *St. griseus* crecido en medio natural sobre fenil-manósido y manósido-estreptomicina, es equivalente. El descenso en la cantidad de metales o de "corn steep", produce aumento de actividad enzimática.

RESUMEN

En esta serie de trabajos en que se trata de establecer la relación entre la nutrición general del *Streptomyces griseus,* su crecimiento y la producción de antibiótico, estudiamos en particular las actividades anteriores en relación con la actividad α-manosidásica.

Se determina la actividad α-manosidásica (en este caso, estreptomanosidásica) del micelio del *Streptomyces griseus,* crecido en medio natural y sintético. Se observa actividad equivalente sobre α-fenil-D-manósido que sobre manósidoestreptomicina.

Se estudian los principales factores que actúan sobre la enzima, como: su constante de Michaelis, el pH óptimo y la acción de varios iones metálicos, como magnesio, zinc, hierro y manganeso, en varias concentraciones.

SUMMARY

In the present paper we try to establish a relationship between the production and characters of α-manosidase (or streptomanosidase) on *Streptomyces griseus* and the biosynthesis or degradation of manoside-streptomycin.

The most important factors having influence on the activity of the enzime are beeing studied, such as: Michaelis's constant, optimun pH and action of some metallic ions such as magnesium, zinc, iron and manganese.

The enzimatic activity on the fenilmanoside and on manoside-streptomycin is equivalent.

BIBLIOGRAFIA

1. Regueiro, B., y Otero, R. 1959. Microbiol. Espań., 12, 1.
2. Schatz, A.; Bugie, E., y Waksman, S. A. 1944. Proc. Soc. Exp. Biol., 55, 66.
3. Schenk, J. R., y Spielman, M. A. 1945. J. Amer. Chem. Soc., 67, 2.276.
4. Titus, E., y Friend, J. 1947. J. Biol. Chem., 188, 393.
5. Langlykke, A. F., y Perlman, D. 1950. U. S. Patent, 249, 3.489.
6. Hockenhull, D. J. D.; Ashton, G. C.; Fantes, K. H., y Whitehead, B. K. 1954. Biochem. J., 57, 93.
7. Perlman, D., y Langlykke, A. F. 1948. J. Amer. Chem. Soc., 70, 3.968.
8. Gottlied, S., y Marsch, P. B. 1946. Ind. Eng. Chem. Anal., 18, 16.
9. Grove, D. C., y Randall, W. A. 1955. Assay Methods of Antibiotics, 211.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

ENSAYOS CON EL 2,4-DICLOROFENOXIACETICO (2,4-D) SOBRE LOS VIRUS RABICO FIJO, POLIOMIELITICO, VACUNAL Y ENCEFALITICO EQUINO OESTE, *IN VITRO* E *IN VIVO*

POR

ANGEL P. GARCIA-GANCEDO, M.ª LUISA ALONSO y EDUARDO GALLARDO

Excepto los llamados grandes virus por su mayor tamaño y complejidad, el resto de los virus todavía perman con prácticamente inatacables por la quimioterapia. A los primeros, que son los pertenecientes al grupo psitacosis-linfogranuloma venéreo, algunos autores no los reconocen como verdaderos virus.

Para ensayar la acción de una sustancia sobre un virus deben tenerse en cuenta las siguientes indicaciones:

Suele haber escasa correlación entre los efectos *in vitro* e *in vivo;* por ejemplo, el mepacrine en una dosis oral de 10 mg. protege a casi todos los ratones inoculados veinticuatro horas después con virus de la encefalitis equina. Pero *in vitro* no ejerce ninguna acción sobre el virus. La inactivación física o química *in vitro* tiene interés para la desinfección de material contaminado y para inactivar el virus en la obtención de vacunas. Parece ser que tampoco existe correlación entre los resultados obtenidos en embrión de pollo y los obtenidos en ratón. Este es el caso del mepacrine, que presenta actividad frente a la encefalitis equina Este en ratón, pero no actúa frente al mismo virus en embrión de pollo.

El resultado puede estar influído por la vía de inoculación del virus y por las características particulares de la cepa utilizada.

A veces, el crecimiento del virus en los animales tratados queda inhibido parcialmente y pueden aparecer síntomas de la enfermedad du-

rante el período de tratamiento o después de él. Muchos autores creen que el virus puede persistir durante un año o más en los tejidos de los animales recuperados clínicamente.

Jones y colaboradores y Rake consideran que consiguiendo altos niveles medios de droga al iniciarse la infección y manteniéndolos después mediante una terapia continuada, se rebaja la cantidad del virus en el animal.

Muchas veces lo que actúa principalmente sobre el virus es la inmunidad engendrada durante el período de tratamiento.

Generalmente, las sustancias activas en alguna forma sobre algunos virus son también activas frente a bacterias; pero en algunos casos, sustancias activas frente a virus no lo son sobre bacterias ni *in vitro*, ni *in vivo*.

En las infecciones de tipo cerebral hay sustancias que pueden ser activas sobre el virus, pero por su especial composición, pH, etc., no son capaces de atravesar la "barrera" sangre-cerebro, como ocurre con la penicilina. Si en vez de inocular el virus por vía intracerebral se hace por vía intraperitoneal, la acción de la droga en algunos casos puede ser francamente positiva, mientras que de la otra forma no lo sería.

Es muy interesante conocer, en primer lugar, la máxima tolerancia del animal frente a la sustancia por las diferentes vías.

El tratamiento simultáneo con más de una sustancia activa no es ventajoso en todos los casos.

Se han realizado numerosos trabajos ensayando muchas y muy diversas sustancias sobre virus, pero nosotros citaremos sólo aquellos que tengan alguna relación con nuestro trabajo, bien por los virus ensayados, o bien por las sustancias utilizadas.

Loggeshall y Maier (1) ensayaron 67 sustancias contra el virus de la poliomielitis adaptado al ratón e inoculado intracerebralmente, con resultado negativo.

Van Den Ende y colaboradores (2) probaron 74 sustancias contra el virus vacunal *in vitro*, sin resultado.

Kramer y colaboradores (3), 190 sustancias contra el virus de la poliomielitis adaptado al ratón inoculado intracerebralmente, como también contra el virus de la encefalitis de San Luis, sin obtener resultados esencialmente positivos.

Cutting y colaboradores (4) utilizaron 150 sustancias frente al virus

de la neurovacuna inoculado intracerebralmente a ratones, y a la vacuna comercial adaptada a embrión de pollo inoculado en saco vitelino o en membrana corioalantoidea. Con sólo 4 sustancias, que son la 3-metilalantoina, 3-etilalantoina, 1,3-dimetiluracilo y etil-n-metilcarbamato, consiguieron únicamente alargar el promedio de vida de los embriones por una fracción de día.

Francis y colaboradores (5) administraron fluoroacetato por vía intravenosa simultáneamente a la inyección por vía subcutánea del virus de la poliomielitis a monos, acortándose mucho el estado de viremia y reduciéndose los casos de parálisis.

Thompson y colaboradores (6-11) evitan la multiplicación del virus vacunal en cultivo de tejidos añadiendo una pequeña cantidad de benzaldehido-tiosemicarbazona, protegiendo también a una buena proporción de ratones infectados intracerebralmente, a los que se obligó a ingerir dicha droga. Tiosemicarbazonas conteniendo grupos tiofeno, piridina, quinolina o isatina, también ejercen acción contra los virus de la vacuna y la viruela, aunque si los resultados clínicamente son buenos, el título en virus de los cerebros de los animales tratados es poco diferente al de los testigos. Las tiosemicarbazonas no protegen a los conejos frente a la vacuna. También han notado estos autores que algunos 5-fenoxitiouracilos poseen un pequeño poder inhibidor del virus vacunal en cultivo de tejidos, protegiendo a ratones inoculados intracerebralmente. Pero obtienen resultados más favorables con el 5-(2,4-diclorofenoxi)-4-hidroxi-2-mercaptopirimidina, introducido oralmente o por vía parenteral. Aunque, si la medicación comienza poco después de la infección, no previene los síntomas de enfermedad, muchos animales tratados se recuperan y en su cerebro hay una cantidad menor de virus equivalente a un logaritmo con respecto a los testigos. Este compuesto no ejerce acción sobre el virus vacunal *in vitro*, ni sobre el virus de la gripe, herpes, encefalitis de San Luis y fiebre del Valle del Rif, en ratones.

Según Schabel y colaboradores (12), el antibiótico netropsin administrado en 2 dosis diarias por vía intraperitoneal, comenzando una hora después de la inoculación intracerebral con pequeñas dosis de virus vacunal, $1DL_{50}$ a $1DL_{90}$, es capaz de proteger a la mayoría de los ratones infectados. Pero no ejerce acción sobre este mismo virus en conejo ni sobre los virus de la gripe A, encefalitis equina Oeste y poliomielitis adaptada a ratón.

Sulkin y colaboradores (13) inoculan ratones intracerebralmente con dosis pequeñas de las encefalitis equinas Este y Oeste y de San Luis, sometiéndolos luego, durante el período de incubación de la enfermedad, a anestesia con éter 2 ó 3 veces, reduciendo la mortalidad en los ratones. Esto no sucede con rabia ni con poliomielitis adaptada a ratón.

Hurst y colaboradores (15 y 15) utilizan rojo tripán por vía intraperitoneal, que protege a ratones inoculados por la misma vía con encefalitis equina Este.

Thompson y colaboradores (16) dicen que contra el virus vacunal inoculado intracerebralmente son útiles el 2,6-dicloro-7-metil purina, el benzimidazol y el 2,6-diaminopurina.

Brown y colaboradores (17) indican que el benzimidazol reduce la mortalidad de los ratones infectados intracerebralmente con virus de la poliomielitis adaptado a ratón.

Powell y colaboradores (18) citan la acción de un producto elaborado por *Penicillium stoloniferum* que es activo en ratones de 12 g. inoculados por vía periférica con poliomielitis adaptada al ratón.

También se ha determinado que el 2,4-diclorofenoxiacético inhibe el crecimiento *in vitro* de bacterias, la germinación de esporas de bacterias como asimismo de mohos (Stevenson y Mitchell (19), Johnson y Colmer (20), etc.).

Por otra parte, se ha encontrado que sustancias iguales o del mismo tipo a las que nosotros utilizamos (fitohormonas o sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, sintéticas) actúan sobre los virus vegetales. Entre ellas citamos las siguientes.

El 2-metil-4-clorofenoxiacético, según Limasset y colaboradores (21), ejerce un efecto inhibitorio temporal sobre el desarrollo de los virus X e Y de la patata, en plantas de tabaco, siendo los efectos más marcados cuando el compuesto se aplica con el inóculo.

Limasset y Cormet (22) sugieren que el hecho de que se encuentre una concentración muy baja del virus del mosaico del tabaco en los meristemos de dichas plantas, puede tener como causa la alta concentración de auxina (fitohormona natural) existente en dicho tejido.

Locke (23) indica que el 2,4-diclorofenoxiacético enmascara los síntomas del enrollamiento de la hoja de la patata. Y también considera que reduce la concentración del virus.

Augier de Montgremier y Morel (24) obtienen resultados que sugie-

ren que se desarrolla menos virus del mosaico del tabaco en tejidos de dicha planta con un alto contenido de naftalenacético.

Kutsky y Rawlins (25) utilizando tejidos del tallo del tabaco cultivado sobre agar, establecen que el naftalenacético al 10^{-4} por 100 en el medio, reduce las cantidades de virus del mosaico del tabaco producidas a las tres-cuatro semanas, en un 20-40 por 100 respecto a las de los testigos.

Nickell (26) dice que concentraciones entre 0,001 a 1 p.p.m. de indolacético, 2,4-diclorofenoxiacético o naftoxiacético estimulan el crecimiento del virus de los tumores de *Rumex acetosa* L. A concentraciones de 1 p.p.m. y superiores, estos compuestos inhiben su crecimiento. El 2,3,5-triyodobenzoico inhibe el crecimiento en todas las concentraciones ensayadas.

Kutsky (27), utilizando los mismos métodos que Kutsky y Rawlins, encuentra que el indolbutírico reduce la cantidad de virus en el mosaico del tabaco.

Nichols (28), pulverizando plantas de tabaco infectadas con virus del mosaico del tabaco, diariamente, con naftalenacético e indolbutírico en la proporción de 100 mg./l., retarda el desarrollo de síntomas y hace decrecer la gravedad de la enfermedad.

Y finalmente, escasos autores han ensayado fitohormonas sobre virus animales.

Citamos a Wooley y colaboradores (29), los cuales prueban 98 productos en ratones infectados intracerebralmente con $1DL_{75}$ de virus de la poliomielitis adaptado a ratón. Cuatro productos únicamente y que son 2,4-diclorofenoxiacético, 3,4-diclorofenoxiacético, 2,4-diclorofenoxipropiónico y 2,5-diclorofenoxiacético, dan unos largos períodos de incubación de la enfermedad y menos muertes, pero los efectos no son muy marcados, no excluyendo los autores un efecto inespecífico de la droga sobre los animales. Ninguno de estos compuestos ejercen acción sobre el virus de la encefalitis de San Luis, ni contra el de la gripe A.

Takemoto y colaboradores (30) publican una lista de fenoxiacéticos sustituídos que no fueron efectivos sobre el virus de la gripe cultivado en embrión de pollo.

MATERIAL Y METODOS

1. Sustancia utilizada

Utilizamos la sal sódica del 2,4-diclorofenoxiacético, procedente de "L. Light and Co. Ltd. Poyle Colnbrook Bucks" (Inglaterra). Se disuelve en solución salina estéril. Su pH es 6,9. Se conserva en frasco estéril tapado con tapón de goma y a la temperatura ambiente.

2. Cepas de virus

a) Virus rábico

Se emplea una cepa que se conserva en cerebro de conejo colocado en glicerina fosfatada estéril de pH 8, a una temperatura de 20° C. Se obtiene un pase reciente en conejo mediante inoculación intracerebral, sacrificándolo cuando está agonizante y paralítico y extrayendo asépticamente el cerebro. Este se tritura asépticamente en un mortero, sin abrasivo, haciéndose una suspensión al 1/5 en solución salina estéril. Se comprueba si durante estas manipulaciones ha ocurrido alguna contaminación del material, en cuyo caso se desecha. Si no se contaminó, se reparte en tubos pequeños de centrífuga, despreciando el sedimento, y se conserva a -20° C.

b) Virus vacunal

El virus procede de pulpa dérmica de ternera rica en virus a la que se ha sometido, para librarla de bacterias, a una filtración a través de bujía Mandler de poro regular. Para ello, la pulpa se tritura en mortero, con abrasivo (arena de cuarzo estéril) y se hace una suspensión al 4 por 100 en caldo glucosado (glucosa al 1 por 100) con pH 8, centrifugado y desechándose el sedimento. Ahora se filtra, recogiéndose el filtrado, se comprueba si éste está libre de bacterias, se liofiliza y se guarda a -20° C.

c) Virus poliomielítico

Utilizamos la cepa SK (New Haven) adaptada al ratón por Jungeblut, conservada en cerebro de ratón colocado en glicerina fosfatada

pH 8 a -20° C. Se obtiene un pase reciente por inoculación intracerebral a ratones. Se extraen los cerebros cuando los ratones están paralíticos y agonizantes. Se comprueba que no están contaminados con bacterias, se trituran asépticamente y se mezclan. Se prepara una supensión al 1/10 en agua destilada estéril con 2 por 100 de suero de conejo y se reparte en tubos pequeños de centrífuga. Se conserva a -20° C.

d) Virus de la encefalitis equina Oeste

La cepa empleada fue aislada por el Dr. Howitt de un cerebro de caballo en California. Se conserva en cerebros de ratón liofilizados y a -20° C. Obtenemos un pase reciente por inoculación intracerebral. Mezclamos todos los cerebros obtenidos, tras de haberlos triturado. Hacemos una suspensión al 1/10 en solución salina y se liofiliza, conservándolo a -20° C.

Todas las cepas se conservan en la Sección de Virus del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología.

3. Animales empleados

Ratones blancos de 18 a 22 g. de peso, libres de enfermedad, procedentes del criadero del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Conejos jóvenes, sometidos a cuarentena antes de su utilización y de peso semejante todos.

4. Titulación de los virus

El virus de la rabia se ha titulado sobre conejo, haciendo diluciones dobles del material virulento e inoculando intracerebralmente un conejo por dilución. El virus vacunal se tituló haciendo diluciones decimales del material e inoculándolas por punción intradérmica en lomo afeitado de conejo, según la técnica de Groth (31). Los virus poliomielítico y encefalítico se titulan sobre ratones según el método de Reed y Muench (32), calculándose la dosis que mata al 50 por 100 de los ratones (DL_{50}).

5. Pruebas de la toxicidad de la sustancia

Ratones. Los animales inyectados de una a 6 veces con 2,4-D 1/100 por las vías subcutánea e intraperitonal en la cantidad de 0,25 cm^3 no representan ninguna anormalidad. Si se hace la misma prueba con la sustancia diluída al 1/50 tampoco ataca a los ratones. Pero al 1/25 mata a casi todos. La sustancia diluída al 1/50, inyectada en la cantidad de 0,03 cm^3 intracerebralmente, no es tóxica.

Conejos. No presentan ninguna reacción tras una inyección subcutánea de 6 cm^3, como tampoco tras 7 dosis de 2 cm^3 con intervalos de veinticuatro horas entre cada dosis. También reciben normalmente inyecciones intravenosas de 1 cm^3 durante siete días consecutivos, como asimismo inyecciones intracerebrales de 0,15 cm^3. Tampoco presentan reacción inoculando 0,20 cm^3 en forma de punturas intradérmicas en lomo afeitado de conejo. Todo ello estando la sustancia diluída al 1/50.

ENSAYOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE LA SUSTANCIA FRENTE A LOS DIVERSOS VIRUS

a) Virus rábico

In vitro

Tomamos en un tubo volúmenes iguales de suspensión virulenta de cerebro de conejo al 1/5 y de solución de 2,4-D al 1/25, las cuales al mezclarlas quedan diluídas al 1/10 y al 1/50, respectivamente. Esta mezcla se agita y se coloca en nevera a 4° C. durante cinco horas. Para utilizarlo como testigo de la resistencia del virus a esta temperatura, colocamos en las mismas condiciones otro tubo con una mezcla de volúmenes iguales de suspensión de virus al 1/5 y solución salina estéril. También se prepara una mezcla de 2,4-D 1/25 y solución salina en volúmenes iguales, para utilizarla también como testigo. Con cada una de estas mezclas se inocula un conejo intracerebralmente en la cantidad de 0,15 cm^3. El conejo testigo de virus muere presentando parálisis. El conejo mezcla de virus y 2,4-D muere treinta y seis horas más tarde que el testigo, presentando parálisis. El conejo testigo de 2,4-D queda normal.

In vivo

Se inoculan 2 conejos con suspensión al 1/10 de cerebro virulento de conejo. Uno de ellos permanece sin transitar testigo de virus. El otro, cinco horas después, recibe 2 cm^3 de solución de 2,4-D al 1/50 por vía subcutánea, lo mismo que otro conejo que no ha sido inoculado con virus y que nos servirá de testigo de toxicidad de la sustancia. Estas inyecciones se repiten cada veinticuatro horas a la misma dosis, haciéndose en total 7 inyecciones. El conejo testigo de 2,4-D permanece normal. El conejo testigo de virus muere tras de presentar parálisis. Y el conejo inoculado con virus y tratado con 2,4-D muere cuarenta horas más tarde que el testigo de virus, presentando parálisis.

Se hace el mismo experimento, pero inyectando al conejo en tratamiento el 2,4-D por vía intravenosa a la dilución de 1/100 y en la cantidad de 1 cm^3 cada vez. Este conejo muere treinta y seis horas después que el testigo de virus, presentando parálisis.

b) Virus vacunal

In vitro

1) Mezclamos volúmenes iguales de suspensión de virus al 1/25 y 2,4-D al 1/25, quedando ambas al 1/50 en la mezcla. También mezclamos volúmenes iguales de virus 1/25 y solución salina estéril quedando el virus diluído al 1/50; y 2,4-D 1/25 con el mismo volumen de solución salina. Estas tres mezclas se colocan a 5° C. durante cinco horas. Después se hacen punturas intradérmicas de 0,20 cm^3 cada una en lomo afeitado de conejo con cada mezcla. Se hace la lectura a los cinco días de la inoculación, obteniéndose el resultado que se indica en la figura 1. La acción del 2,4-D es francamente positiva.

Por otra parte, realizamos los experimentos siguientes:

2) Con la pulpa de ternera triturada y usando como diluyente una solución de 2-4-diclorofenoxiacético al 1/100, hacemos las siguientes suspensiones de virus: 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Hacemos también las mismas suspensiones de virus utilizando como diluyente solución salina, con objeto de utilizarlas como testigo. Se incuban ambas durante veinticuatro horas a 4° C. Y con estas dos series se hacen 2

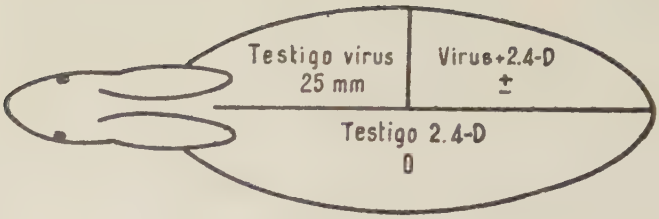


Figura 1

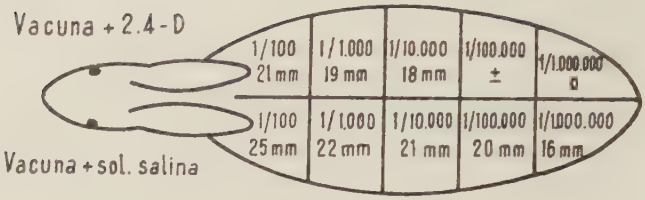


Figura 2

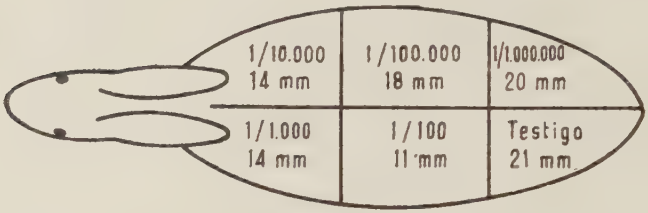


Figura 3

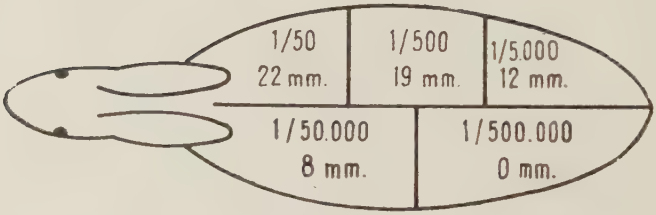


Figura 4

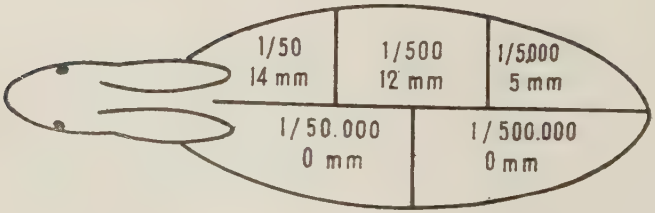


Figura 5

filas paralelas de punturas intradérmicas, inoculando 0,20 cm³ de cada suspensión en lomo afeitado de conejo, según la técnica de Groth. Cinco días después de la inoculación se miden las lesiones producidas, con un calibrador, obteniéndose los resultados que se indican en la figura 2.

Puede observarse una marcada diferencia entre las dos series de punturas. Las producidas por la mezcla de virus y 2,4-D son inferiores en diámetro a las producidas por el virus con solución salina en la cantidad de 4, 3, 3, 20 y 16 mm., respectivamente

3) Preparamos una suspensión de pulpa vacunal al 1/100 en solución salina, y manteniendo ésta constante, la mezclamos a volúmenes iguales con diluciones decimales progresivas de 2,4-D (1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000). Hacemos también una mezcla a partes iguales de la suspensión de virus 1/100 con solución salina para que nos sirva como testigo. Mantenemos estas mezclas durante veinticuatro horas a 4° C. Después, con cada una de ellas inoculamos 0,20 cm³ por puntura intradérmica a un conejo, obteniéndose los resultados que se presentan en la figura 3, al medir las lesiones cinco días después de la inoculación.

Entre la puntura testigo de virus y las restantes se observan diferencias de tamaño, siendo éstas inferiores en 10, 7, 7, 3 y 1 mm. comparadas con aquél.

In vivo

Preparamos suspensiones de virus en solución salina al 1/50, 1/500, 1/5.000, 1/50.000 y 1/500.000. De cada una de ellas hacemos una puntura, 0,20 cm³ en el lomo afeitado de 2 conejos. Uno de éstos queda sin tratamiento posterior, como testigo. El otro, cinco horas después, recibe 2 cm³ de 2-4-D 1/25 subcutáneamente, dosis que se repite cada veinticuatro horas, hasta un total de 5 inyecciones. Se hace la lectura de los 2 conejos a los cinco días de la inoculación del virus, obteniéndose los resultados que indican las figuras 4 (conejo tratado) y 5 (conejo testigo).

Se observan unas diferencias en el diámetro de las lesiones, siendo menores las del conejo tratado. Estas diferencias son de 8, 7, 7 y 8 mm. para cada lesión, respectivamente.

c) Virus poliomielítico

In vivo

Se prepara una suspensión de cerebro virulento de ratón de forma que en 0,03 cm^3 de dicha suspensión haya 200 dosis letales 50 por 100 para ratón del virus en cuestión (200 RDL_{50}). El material virulento se diluye en agua destilada estéril con un 2 por 100 de suero de conejo. Con esta suspensión se hace una mezcla a volúmenes iguales con 2,4-D 1/25 quedando éste al 1/50 y el virus a 100 DL_{50} en cada 0,03 cm^3. También se mezcla la suspensión de virus con otro volumen igual de agua destilada estéril con 2 por 100 de suero de conejo, para utilizarlo como testigo de virus, quedando 100 DL_{50} del virus en cada 0,03 cm^3. Por otra parte, se hace otra mezcla de 2,4-D 1/25 con agua destilada con 2 por 100 de suero de conejo a volúmenes iguales, quedando el 2,4-D al 1/50. Con cada una de estas mezclas se inocula un grupo de ratones. El grupo de ratones testigos de 2,4-D permanece normal. Los ratones de los grupos de testigos de virus y virus con 2,4-D mueren todos y en las mismas fechas.

En el cuadro 1 se registran los resultados obtenidos en ratones *in vitro* e *in vivo* con los virus poliomielítico y encefalítico equino Oeste, expresándose en porcentajes.

In vivo

Se prepara una suspensión de material virulento de forma que contenga en 0,03 cm^3 100 DL_{50} del virus. Con ella inoculamos 3 grupos de ratones. Cinco horas después, a los ratones de un grupo se les inyectan 0,25 cm^3 de solución de 2,4-D por vía subcutánea, y a otro grupo la misma cantidad y dilución de 2,4-D, pero por vía intraperitoneal. El grupo de ratones restante queda sin tratar como testigo de virus. Veinticuatro horas después se repite el tratamiento. Un 75 por 100 de los animales tratados mueren en las mismas fechas que los testigos y un 25 por 100, de veinticuatro a cuarenta y ocho horas más tarde.

d) Virus de la encefalitis equina Oeste

In vitro

Se mezcla un volumen de la solución de 2,4-D al 1/25 con otro volumen igual de suspensión de virus, de forma que en la mezcla quede el 2,4-D diluído al 1/50 y en 0,03 cm^3 que es el volumen que

Cuadro 1. Quimioterapia con 2,4-D. Ratones

	Virus	Días tras la infección — Porcentaje de muertes																		Porcentajes totales	
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Muertos	Supervivientes
In vitro	Polio	50	50																	100	0
	Testigo	50	50																	100	0
	Encef. O..					12		6	6	6										30	70
	Testigo		34	36	24	6														100	0
In vivo	Polio	25	50	13	12															100	0
	Testigo	50	50																	100	0
	Encef. O..						8	24		8		8			16				8	72	28
	Testigo			75	25															100	0

se inocula a cada ratón, 100 DL_{50}. También se prepara una solución de 2,4-D al 1/50 para emplearla como testigo del 2,4-D. Y otra mezcla de virus y solución salina, quedando 100 DL_{50} del virus por cada 0,03 cm^3 para utilizarla como testigo de virus. Las mezclas se incuban a 4° C. durante cinco horas y se inyectan intracerebralmente a grupos de ratones en la cantidad de 0,03 cm^3. Se hace otro experimento semejante, pero sometiendo las mezclas a dieciocho horas de incubación a 4° C. Y otro sometiendo las mezclas a la misma temperatura durante veinticuatro horas. Los ratones inoculados con el 2,4-D permanecen normales. Los ratones inoculados con testigo de virus mueren todos, presentando parálisis. Sin embargo, los ratones inoculados con las mezclas de virus y 2,4-D, sobreviven en la proporción de un 70 por 100 y los que mueren (un 30 por 100) lo hacen en su mayor parte de uno a cuatro días más tarde que los testigos. No hay diferencias grandes derivadas de los diferentes períodos de incubación.

Estos ratones supervivientes se reinoculan con 100 DL_{50} del mismo virus y, salvo un ratón, resisten esta nueva inoculación.

In vivo

Con 100 DL_{50} del virus, se inoculan intracerebralmente 4 grupos de ratones. Un grupo queda sin tratamiento posterior, como testigo de virus. Otro grupo se inyecta cinco horas después con 0,25 cm^3 de la solución 1/50 de 2,4-D por vía subcutánea. Otro grupo se inyecta lo mismo, pero dieciocho horas después de la infección. Y el otro, veinticuatro horas después de la infección. Los ratones testigos mueren todos. Pero los tratados, en un 72 por 100, mueren de dos a catorce días más tarde que los testigos, habiendo un 28 por 100 de supervivientes. Estos supervivientes se reinoculan con 100 DL_{50} de virus y sobreviven, menos uno que muere diez días después. No se observan grandes diferencias entre los 3 grupos de ratones tratados.

RESULTADOS

Virus rábico. Tanto *in vitro* como *in vivo*, el 2,4-D prolonga la vida de los animales por un corto espacio de tiempo (hasta un día y medio), período que no consideramos significativo y lo damos como negativo.

Virus vacunal. In vitro, gran diferencia de tamaño en las lesiones con respecto al testigo; francamente positivo. *In vivo,* diferencias de 7 a 8 mm. en el diámetro de las lesiones con respecto al testigo; positivo.

Virus poliomielítico. In vitro, negativo. *In vivo,* prolonga la vida de los ratones de uno a dos días, pero este período no lo consideramos significativo; por tanto, negativo.

Virus encefalítico equino Oeste. In vitro, inactiva parcialmente el virus; da una elevada proporción de supervivientes (70 por 100) que resisten la reinoculación; positivo. *In vivo,* los ratones prolongan su vida de dos a diecinueve días más que los testigos y hay cierta proporción de supervivientes (28 por 100), los cuales resisten la reinoculación; positivo.

Por tanto, acción francamente positiva del 2,4-D sobre los virus encefalítico equino Oeste y vacunal; y puede considerarse negativa sobre los virus rábico y poliomielítico.

DISCUSION

La acción positiva se ejerce sobre virus tan dispares como el vacunal, dermotropo, de gran tamaño (225 mm.) y complejidad; y el encefalítico equino Oeste, neurotropo, de pequeño tamaño (50 mm.) y más simple.

La acción ejercida por la sustancia sobre los virus parece ser de inactivación parcial, ya que no todos los ratones sobreviven, y además los supervivientes poseen inmunidad, lo que parece indicar que han soportado dosis subletales del virus.

El 2,4-D inactiva parcialmente el virus vacunal. El grado de inactivación es inversamente proporcional a la cantidad de virus, y directamente proporcional a la cantidad de 2,4-diclorofenoxiacético. Esto puede deducirse fácilmente de los resultados obtenidos en conejos, *in vitro* (experimentos 2 y 3).

Por otra parte, aunque con notable diferencia, parece que su acción se extiende a todos los virus ensayados, lo que nos podría indicar que la acción de la sustancia no es específica, como ocurre cuando actúa sobre los vegetales.

En los vegetales el 2,4-D actúa sobre varios procesos enzimáticos, entre los que destacan algunos respiratorios. Carecemos de base para determinar su forma de actuar en el caso que nos ocupa, pero pudiera

ser que esta sustancia más que actuar sobre los virus directamente lo hiciera sobre las células, introduciendo un factor que alterara en alguna forma la biosíntesis de las partículas víricas.

Hay autores que indican que se deben buscar sustancias que intervengan en el metabolismo de la célula huésped. Katsilabros (33) utiliza con éxito colchicina y un derivado de ésta sobre algunos virus, achacando los resultados a su acción antimitótica más que a una posible acción directa sobre el virus.

Es interesante destacar que se inoculan siempre 100 DL_{50} a cada ratón, dosis elevada, por lo cual los resultados deben considerarse bastante significativos. Además, las vías de inoculación de los virus son muy directas (vía intracerebral), lo que da aún mayor valor a los resultados, ya que probablemente la actividad de la sustancia sería mayor si el virus se inyectara por otras vías menos directas que, por otra parte, son las de infección natural.

RESUMEN

El 2,4-diclorofenoxiacético inactiva parcialmente *in vitro* e *in vivo* a los virus vacunal y encefalítico equino Oeste.

SUMMARY

The 2-4 diclorophenoxyacetic acid partially inactives *in vitro* and *in vivo* the vaccinia and western equine encephalitis viruses.

BIBLIOGRAFIA

1. Coggeshall, L. T., y Maier, J. 1942. J. Pharmacol., 76, 161.
2. Ende, M. van den; Andrewes, C. M., y King, H. 1943. J. Path. Bact., 59, 173.
3. Kramer, S. D.; Geer, H. A., y Szobel, A. D. 1944. J. Inmunol., 49, 273.
4. Cutting, W. C.; Dreisbach, R. H.; Halpern, R. M.; Irwin, E. A.; Jenkis, D. W.; Proescher, F., y Tripi, H. B. 1947. J. Inmunol., 57, 379.
5. Francis, T.; Brown, G. C., y Kandel, A. 1954. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 85, 83.
6. Thompson, R. L.; Price, M. L., y Minton, S. A. 1951. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 78, 11.

7. Thompson, R. L.; Minton, S. A.; Officer, J. E., y Hitchings, G. H. 1953. J. Inmunol,., 70, 229.
8. Minton, S. A.; Officer, J. E., y Thompson, R. L. 1953. J. Inmunol., 70, 222.
9. Thompson, R. L.; Davis, J.; Rusell, P. B., y Hitchings, G. H. 1953. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 84, 496.
10. Thompson, R. L.; Minton, S. A.; Officer, J. E., y Hitchings, G. H. 1953. J. Inmunol., 70, 229.
11. Thompson, R. L.; Price, M.; Minton, S. A.; Falcó, E. A., y Hitchings, G. H. 1953. J. Inmunol., 67, 483.
12. Schabel, F. M.; Laster, W. R.; Brockman, R. W., y Skipper, H. E. 1953. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 83, 1.
13. Sulkin, S. E.; Zarafonetis, C., y Goth, A. 1946. J. Exp. Med., 84, 277.
14. Hurst, E. W.; Melvin, P., y Peters, J. M. 1952. Brit. J. Pharmacol, 7, 455.
15. Hurst, E. W.; Peters, J. M., y Melvin, P. 1952. Brit. J. Pharmacol, 7, 473.
16. Thompson, R. L.; Price, M. L.; Minton, S. A.; Elion, G. B., y Hitchings, G. H. 1950. J. Inmunol., 65, 529.
17. Brown, G. C.; Craig, D. E., y Kandel, A. 1953. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 83, 408.
18. Powell, H. M., y Culbertson, C. G. 1953. Proc, Soc. Exp. Biol. Med., 83, 161.
19. Stevenson, E. C., y Mitchell, J. W. 1945. Science, 101, 642.
20. Johnson, E. J., y Colmer, A. R. 1955. App. Microb., 3, 2.
21. Limasset, P.; Levieil, F., y Sechet, M. 1948. Compt. Rend. Acad. Sci., 227, 643.
22. Limasset, P., y Cormet, P. 1949. Compt. Rend. Acad. Sci., 223, 1971.
23. Locke, S. B. 1943. Phytopath., 38, 916.
24. Augier de Montgremier, H., y Morel, G. 1948. Compt. Rend. Acad. Sci, 227, 688.
25. Kutsky, R. J., y Rawlins, T. E. 1950. J. Bact., 60, 763.
26. Nickell, L. G., 1950. Ann. J. Bot., 37, 829.
27. Kutsky, R. J. 1952. Science, 115, 19.
28. Nichols, C. W. 1952. Phytopath., 42, 579.
29. Wooley, J. G.; Bond, H. W., y Perrine, T. D. 1952. J. Inmunol., 68, 621.
30. Takemoto, K. K.; Robbins, M. L., y Smith, P. K. 1954. J. Inmunol., 72, 139.
31. Groth, A. 1929. Ergb. Hyg. Bakt., 10, 335.
32 Reed, J., y Muench, H. 1938. Amer. J. Hyg., 27, 493.
33. Katsilabros, L. 1958. Arch. Inst. Pasteur Hellenique, 4, 159.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

ENSAYOS CON EL INDOL-3-ACETICO SOBRE LOS VIRUS RABICO FIJO, POLIOMIELITICO, VACUNAL Y ENCEFALITICO EQUINO OESTE, *IN VITRO* E *IN VIVO*

POR

ANGEL P. GARCIA-GANCEDO, M.ª LUISA ALONSO y EDUARDO GALLARDO

En un trabajo anterior (1) hacemos algunas consideraciones sobre la quimioterapia de los virus. También damos cuenta de unos ensayos realizados con una fitohormona o sustancia reguladora del crecimiento vegetal, que es el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), para determinar su posible actividad sobre los mismos virus que son objeto de este trabajo. Los resultados obtenidos parecían apoyar la hipótesis de que dicha sustancia actúa de forma inespecífica, de manera semejante a como lo hace sobre los vegetales. Para aportar nuevos datos que contribuyan a aclarar dicha cuestión realizamos el presente estudio utilizando otra fitohormona (auxina natural), el indol-3-acético, empleando los mismos materiales y métodos que en el anterior trabajo. Siendo por tanto válidas para éste las citas bibliográficas que se indican en aquél.

MATERIAL Y METODOS

1. Sustancia utilizada

Se emplea el indol-3-acético procedente de la casa Merck de Darmstadt. Se disuelve difícilmente en solución salina estéril. Ajustamos el pH a 7. Se conserva a la temperatura ambiente en un matraz cerrado con tapón de goma.

2. Cepas de virus

Virus rábico fijo, vacunal de tipo dérmico, poliomielítico adaptado a ratón y encefalítico equino este, cuyo origen, características, forma de conservación, etc., se indican en el citado trabajo anterior. Todas ellas se conservan en la Sección de Virus del Instituto "Jaime Ferran", de Microbiología. De todas ellas se obtienen pases recientes a partir de los cuales se realizan todos los experimentos utilizando siempre virus procedente del mismo lote.

3. Animales empleados

Ratones blancos de 18 a 22 g. de peso, procedentes del criadero del Centro de Investigaciones Biológicas del C. S. I. C. Conejos jóvenes, sometidos a cuarentena antes de utilizarlos, siendo todos de un peso semejante.

4. Titulación de los virus

El rábico se titula inoculando 0,15 cm^3, intracerebralmente, de diluciones dobles de la suspensión virulenta de cerebro de conejo, a 1 conejo por cada dilución. El virus vacunal, mediante punturas intradérmicas en lomo de conejo, según la técnica de Groth (2) de diluciones decimales de la suspensión del virus, inyectado 0,20 cm^3 por puntura de cada dilución. Los virus encefalítico equino Oeste y poliomielítico los titulamos intracerebralmente, en ratones, aplicando el método de Reed y Muench (3), calculando así la dosis letal 50 por 100 (DL_{50}).

5. Pruebas de la toxicidad de la sustancia

Ratones. A un lote se le inyecta 0,25 cm^3, por vías subcutánea e intraperitoneal, de la solución de indol-3-acético al 1/100, cada veinticuatro horas durante tres días, sin que les produzca ningún efecto. También permanecen normales los inoculados intracerebralmente con 0,03 cm^3 de la sustancia a la dilución indicada.

Conejo. Por vía subcutánea se les inyecta 2 cm^3 diariamente hasta un total de 7 veces, con la sustancia diluida al 1/100, sin observarse

ninguna manifestación anormal. Asimismo, punturas intradérmicas de 0,20 cm^3 de la sustancia a la misma dilución indicada anteriormente no producen ninguna reacción en los conejos ensayados.

ENSAYOS REALIZADOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE LA SUSTANCIA FRENTE A LOS DIVERSOS VIRUS

a) Virus rábico

In vitro

Se mezclan por partes iguales una suspensión de virus al 1/5 con solución de la sustancia al 1/50, quedando entonces al 1/10 el virus y al 1/100 la sustancia. Hacemos otra mezcla de suspensión de virus al 1/5 con solución salina a volúmenes iguales, quedando también el virus al 1/10, para utilizarle como testigo de virus. Y finalmente, preparamos una solución 1/100 de la sustancia, como testigo también. Estas mezclas se colocan durnate cinco horas a 4° C., y después se inoculan 3 conejos, uno con cada mezcla, por vía intracerebral, en la cantidad de 0,15 cm^3. El conejo inyectado con el indol-3-acético permanece normal. El conejo inoculado con la mezcla de virus y sustancia muere siete horas más tarde que el testigo y ambos presentando parálisis.

In vivo

Se inyectan 2 conejos por vía intracerebral con 0,15 cm^3 de la suspensión al 1/10 del virus. Uno de ellos, cinco horas más tarde, con 2 cm^3 de la solución 1/100 de la sustancia por vía subcutánea. Al mismo tiempo y en la misma forma, se inyecta la misma dosis de sustancia a otro conejo, que nos servirá de testigo de toxicidad de dicha sustancia. En ambos conejos se repiten estas inyecciones cada veinticuatro horas, poniéndose en total 7 inyecciones a cada uno. También se ha inoculado un conejo como testigo de virus, el cual permanece sin tratamiento. El conejo inyectado con indol-3-acético permanece normal. El conejo inoculado con virus y tratado con indol-3-acético muere siete horas más tarde que el conejo testigo de virus, presentando parálisis ambos.

Se hace el mismo tratamiento indicado anteriormente a otro conejo

infectado, pero inyectando 1 cm^3 de la sustancia por vía intravenosa, y este conejo muere doce horas después que el testigo.

b) Virus vacunal

In vitro

Se prepara una suspensión de virus al 1/25 en solución salina, que al mezclarse con el mismo volumen de indol-3-acético o de solución salina estéril queda al 1/50. Mezclamos aquella con indol-3-acético al 1/50, quedando éste al 1/100. También hacemos otra mezcla a volúmenes iguales de virus con solución salina estéril, para usarla como testigo de virus. Y se prepara una solución de sustancia al 1/100 para utilizarla

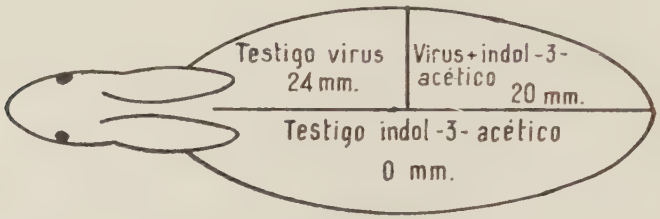


Figura 1

como testigo de indol-3-acético. Estas tres mezclas se colocan a la temperatura de 4° C. durante cinco horas. Con cada una de ellas se hace entonces una puntura intradérmica de 0,20 cm^3 en el lomo afeitado del mismo conejo. Se miden las lesiones a los cinco días de la inoculación, obteniéndose los resultados que indica la figura 1. La lesión producida por la mezcla de virus y sustancia es 4 mm. menor que la lesión testigo de virus. Este resultado es poco significativo.

In vivo

Se preparan suspensiones de virus en solución salina al 1/50, 1/500, 1/5.000, 1/50.000 y 1/500.000. Con cada suspensión se hace una puntura de 0,20 cm^3 a 2 conejos. Uno de ellos queda sin someterse a posterior tratamiento, como testigo de virus. El otro conejo recibe después de cinco horas una dosis de 2 cm^3 de indol-3-acético por vía subcutánea, dosis que se repite cada veinticuatro horas hasta alcanzar un total de

5 inyecciones. A los cinco días de la inoculación del virus se hace la lectura en los dos conejos, con los resultados que indican las figuras 2 (conejo testigo) y 3 (conejo tratado).

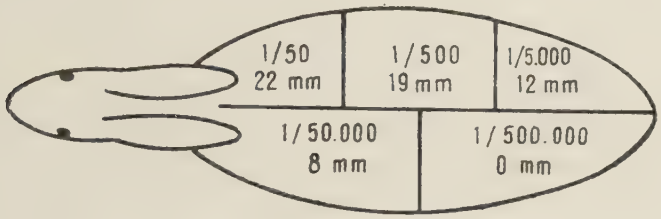


Figura 2

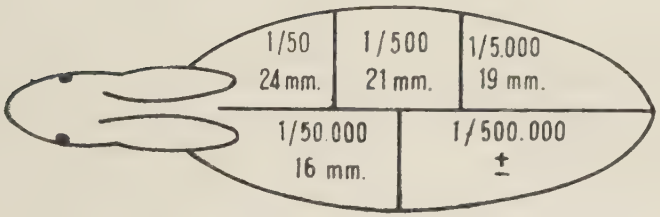


Figura 3

Se observa que las lesiones del conejo tratado son algo mayores que las del conejo testigo de virus. Estas diferencias son de 2, 2, 7 y 8 mm. para cada dilución, repectivamente.

c) Virus poliomielítico

In vitro

Se hace una suspensión de material virulento en agua destilada estéril con 2 por 100 de suero de conejo, de forma que en 0,03 cm^3 de dicha suspensión haya 200 DL_{50} del virus. Partiendo de esta suspensión se hace una mezcla por partes iguales con indol-3-acético diluída al 1/50, quedando en la mezcla éste al 1/100 y el virus a 100 DL_{50} en cada 0,03 cm^3. Se hace, por otra parte, una dilución del virus en agua destilada estéril con 2 por 100 de suero de conejo de manera que queda 100 DL_{50} del virus en cada 0,03 cm^3, para utilizarla como testigo de

virus. También se prepara una solución de la sustancia al 1/100 para utilizarla como testigo del indol-3-acético. Con cada una de estas tres mezclas o diluciones se inocula un grupo de ratones por vía intracerebral, en la cantidad de 0,03 cm^3 a cada uno, después de haber estado aquéllas durante cinco horas a la temperatura de 4° C. y habiéndose comprobado que no ha habido contaminación con gérmenes extraños. Los ratones inoculados con el testigo de indol-3-acético no presentan anormalidad alguna. Los ratones inoculados con la mezcla de virus e indol-3-acético mueren todos, el 50 por 100 en las mismas fechas que los testigos y el otro 50 por 100 uno a dos días más tarde.

En el cuadro 1 se indican los resultados obtenidos sobre los virus poliomielítico y encefalítico equino Oeste *in vitro* e *in vivo*, expresados en porcentajes.

In vivo

Se inoculan 3 grupos de ratones con 100 DL_{50}. A las cinco horas de dicha inoculación se trata un grupo con 0,25 cm^3 de indol-3-acético, por vía subcutánea, y otro grupo con la misma dosis, pero por vía intraperitoneal. Se repite en ambos grupos el tratamiento veinticuatro horas más tarde. El grupo restante queda sin tratar, como testigo de virus. Tanto los ratones tratados como los testigos de virus mueren en las mismas fechas.

Cuadro 1. Quimioterapia con indol-3-acético en ratones

	Virus	Días tras la infección (Porcentaje de muertes)													Porcentajes totales	
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Muertos	Supervivientes
In vitro	Polio		50	25	25											100	0
	Testigo	50	50													100	0
	Encef. O				6				6		6					18	82
	Testigo		34	42	12	12										100	0
In vivo	Polio	50	50													100	0
	Testigo	50	50													100	0
	Encef. O				8	8		16	8	8	24				8	80	20
	Testigo		25	50	25											100	0

d) Virus de la encefalitis equina Oeste

In vitro

Preparamos una mezcla, a volúmenes iguales, de solución de indol-3-acético al 1/50 con suspensión de virus que contenga 200 DL_{50} en 0,03 cm^3, para que la dilución final del virus sea de 100 DL_{50} por cada 0,03 cm^3 y la de la sustancia del 1/100. Se coloca la mezcla en nevera a 4° C. Una parte de esta mezcla se inocula, después de cinco horas a 4° C., a un grupo de ratones por vía intracerebral, en la cantidad de 0,03 cm^3 a cada uno.

Otra parte de la mezcla citada al principio se inocula de la misma forma a otro grupo de ratones, después de dieciocho horas de incubación a 4° C. Y otra parte de dicha mezcla se inocula a otro grupo de ratones, a las veinticuatro horas de incubación a 4° C. Casi todos los ratones sobreviven (un 82 por 100). Estos se reinoculan con 100 DL_{50} del virus por vía intracerebral y sobreviven de nuevo. En cada experimento se han inoculado el mismo número de ratones testigos con 100 DL_{50} del virus, habiéndose sometido éste a la misma permanencia en nevera a 4° C, muriendo todos los ratones entre tres y seis días. Y también se han inyectado ratones por la misma vía que los anteriores y en la misma cantidad con la solución 1/100 del indol-3-acético, sin que éstos manifestaran ningún síntoma anormal. No se observan diferencias entre los diversos tiempos de incubación.

In vivo

Se inoculan intracerebralmente 4 grupos de ratones con 100 DL_{50} de virus. Un grupo queda sin posterior tratamiento para utilizarlo como testigo de virus. Otro grupo, cinco horas después de la infección, se inyecta con 0,25 cm^3 de solución al 1/100 de indol-3-acético, por vía subcutánea. Otro grupo se trata de la misma forma dieciocho horas después de la infección. Y el grupo restante recibe el mismo tratamiento veinticuatro horas más tarde de la infección. Los ratones testigos mueren todos. De los ratones tratados sobrevive un 20 por 100 y los que mueren (80 por 100) lo hacen más tarde que los testigos de virus (alguno hasta diez días más tarde). Los ratones supervivientes se reinoculan por vía intracerebral con 100 DL_{50} del virus y resisten esta segunda infección. No se han encontrado diferencias significativas debidas a los diferentes intervalos de tratamiento.

RESULTADOS

Virus rábico. Tanto *in vitro* como *in vivo,* mueren los animales tratados y los testigos, con una diferencia de tiempo tan escasa (siete a doce horas) que puede considerarse que lo hacen al mismo tiempo, estimándose los resultados como negativos.

Virus vacunal. Tanto *in vitro* como *in vivo,* también se considera negativo.

Virus poliomielítico. Aunque un 50 por 100 de los ratones pertenecientes a los experimentos realizados *in vivo* mueren de uno a dos días más tarde que los testigos, consideramos esto poco significativo y damos como negativos todos los resultados obtenidos, tanto *in vitro* como *in vivo.*

Virus encefalítico equino Oeste. In vitro, resulta una inactivación parcial del virus, obteniéndose una elevada proporción de ratones supervivientes (82 por 100); resultado positivo. *In vivo,* quedan escasos supervivientes (20 por 100), pero la gran mayoría de los ratones que mueren lo hacen bastante más tarde que los testigos, pudiendo darse este resultado como medianamente positivo. Todos los ratones supervivientes presentan inmunidad, resistiendo la reinoculación.

DISCUSION

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y asociándolos a otros trabajos anteriores, puede decirse que la cepa empleada del virus encefalítico Oeste es particularmente sensible a la acción de dos fitohormonas, el 2,4-diclorofenoxiacético y el indol-3-acético. El modo de acción de ambas sustancias parece que es semejante. Sin embargo, es diferente a la acción sobre este virus *in vitro* por la fenacina -α- carboxilamida.

Nosotros pensamos que, a elevada concentración, estas sustancias 2,4-diclorofenoxiacético e indol-3-acético) son capaces de provocar una disminución en la cantidad de ácidos nucleicos en los tejidos, como indican Silberger y colaboradores (5). También deben influir en la divi-

sión celular, como Louis (6) encuentra en cultivo de corazón de embrión de pollo, reduciéndose fuertemente el número de mitosis al emplearse altas concentraciones de indol-3-acético. Todo ello repercute indudablemente en la multiplicación de las partículas víricas inyectadas.

Es interesante citar que Apffel (7), empleando ésteres de los ácidos 2,4-diclorofenoxiacético y 2, 4, 5-triclorofenoxiacético, consiguió la curación de diversos tumores en animales.

RESUMEN

El indol-3-acético inactiva parcialmente *in vitro* e *in vivo*, el virus encefalítico equino Oeste.

SUMMARY

The acid indolyl-3-acetic partially inactives *in vitro* and *in vivo* the western equine encephalitis virus.

BIBLIOGRAFIA

1. García-Gancedo, A. P.; Alonso, M.ª Luisa, y Gallardo, E. 1960. Microbiol. Españ., 13, 31.
2. Groth, A. 1929. Ergbe. Hyg. Bakt., 10, 355.
3. Reed, J., y Muench, H. 1938. Amer. J. Hyg., 27, 493.
4. García-Gancedo, A. P., y Sierra, G. 1959. Ant. van Leeuw., 25, 350.
5. Silberger, J., y Skoog, F. 1953. Science, 118, 443.
6. Louis, R. 1955. Zeitschr. f. Zellfors., 41, 385.
7. Apffel, C. A. 1959. Vet. Record., 71, 148.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

NUEVO ESTUDIO BIOLOGICO DEL GENERO *AZOTOBACTER* (DESCUBRIMIENTO DE SUS FORMAS *L*)

POR
J. MORALES

INTRODUCCION

El género *Azotobacter* fue descrito por Beijerinck (5) en el año 1901. Anteriormente, Winogradsky (117), en 1895, había descubierto la fijación anaerobia; por consiguiente, el género *Azotobacter* fue la primera bacteria aerobia fijadora del nitrógeno. Es muy posible que fuese conocida desde más antiguo, debido a su gran tamaño y abundancia, y que el propio Leeuwenhoek la observase en los canales de Delft. Su hallazgo e identificación no fue fácil, pues desde el primer momento tropezaron con diversidad de formas y variabilidad de su dotación enzimática, que le hacían incluso perder su principal cualidad, la de fijar el nitrógeno, y que le hicieron dudar al propio Beijerinck sobre esta propiedad fijadora del nitrógeno.

Desde su descubrimiento se ha trabajado muy intensamente sobre esta bacteria por su gran interés científico y práctico. Nosotros, en el presente trabajo, nos propusimos estudiar su distribución en los suelos y aguas españoles, las relaciones que pudiera tener la presencia de esta bacteria con el pH, cantidad de calcio y materia orgánica de estos suelos como igualmente de las aguas. Asimismo, creímos oportuno realizar una comprobación y posible ampliación de los numerosos estudios existentes sobre su citología, actividades bioquímicas y sistemática. Donde más nos hemos detenido y creemos haber conseguido más fruto en nuestras modestas aportaciones es en lo que se refiere a sus formas y ciclos biológicos, por ser precisamente donde reinaba más confusión, pues entre

otras cosas sobre la biología de este género, existen dos interpretaciones opuestas defendidas por sus correspondientes escuelas; de una parte, las ideas pleomorfistas mantenidas especialmente por Löhnis y algunos autores más modernos, como Bisset, los cuales son partidarios de multitud de formas, y por otra parte, Winogradsky, al que también siguen algunos autores modernos, como Eisenstark, que es partidario incondicional del monomorfismo para esta bacteria o admite muy pocas formas apoyándose en lo que él llama el "principio ecológico" y que consiste esencialmente en usar medios de cultivo muy pobres en sales y materia nutritiva.

Para aclarar la biología del *Azotobacter* y ver hasta donde pueden admitirse las teorías pleomorfistas o monomorfistas, nos propusimos buscar las formas y ciclos *L* de esta bacteria. Las formas *L* han sido estudiadas por numerosos autores en estos últimos años; en España son notables los trabajos del Dr. Rubio Huertos (96), pero no conocemos ningún trabajo sobre formas *L* del *Azotobacter*. En este trabajo nosotros describimos las formas y los ciclos *L* correspondientes al género *Azotobacter;* algunas de estas formas, por pura coincidencia, pueden corresponder con alguna de las formas descritas por los pleomorfistas, pues las formas descritas por éstos son tan numerosas que no es raro se produzcan estas coincidencias; pero desde luego, en ningún caso, ni los métodos ni la interpretación de estas formas coincide con los ideas de los pleomorfistas. Por otra parte, existen muchas formas descritas por los pleomorfistas, como las formas esporuladas, que no hemos podido encontrar en nuestro laboratorio.

Los estudios efectuados sobre las formas *L* y sus ciclos permiten dar correcta interpretación a numerosas formas del *Azotobacter*, delimitar perfectamente el monomorfismo y pleomorfismo de esta bacteria, y también interpretar un ciclo biológico normal en el suelo.

MUESTRAS ENSAYADAS

Las muestras de suelos utilizadas para este trabajo han sido facilitadas, en parte, por el Instituto de Edafología del C. S. I. C., y se eligieron de la colección de forma que estuvieran representados los diversos tipos de suelos, tales como suelos de pH básico, ácido o neutro; suelos salinos, con abundante sulfato cálcico, con gran cantidad de materia or-

gánica, unos de ellos, y otros, por el contrario, con materia orgánica escasa, etc. Dentro de estas características se eligieron, unos con las partículas finas; otros, gruesas, etc. De estas muestras, algunas eran bastante antiguas y otras de recolección más moderna. De igual forma recogimos nosotros mismos numerosas muestras de suelos, que, junto con las que nos enviaron directamente, fueron estudiadas inmediatamente después de su recolección, sin que hubieran sufrido desecación o alteración.

Análogamente estudiamos aguas de distintos lugares de Madrid, acequias y estanques de riego, fuentes públicas, lago de la Casa de Campo, charcos de la misma Casa de Campo, Jardín Botánico, Jardines del Retiro, Jardines del Museo de Ciencias Naturales, etc. Las aguas eran recogidas en frascos estériles y sembradas en un plazo de dos o tres horas después de su recogida.

En las muestras de suelos facilitadas por el Instituto de Edafología nos dieron amablemente también a conocer el pH, cantidad de materia orgánica y cantidad de calcio de las mismas; en las muestras de suelos recolectadas por nosotros y en las aguas, estos datos fueron determinados en nuestro laboratorio.

Medios de cultivo

Para el aislamiento, purificación y estudio de estas bacterias utilizamos 3 medios de cultivo, fundamentalmente, que designamos por medio A, medio B y medio C, respectivamente: en los 3 medios utilizamos la solución basal de Winogradsky, compuesta por las sales siguientes:

Fosfato dipotásico	0,5 g.
Sulfato magnésico	0,2 g.
Cloruro sódico	0,5 g.
Sulfato de manganeso	Indicios
Cloruro férrico	Indicios
Agua destilada	1.000 cm^3

A partir de esta solución obteníamos los siguientes medios:

Medio A

Benzoato sódico al 1 %	20 cm^3
Acetato cálcico al 10 %	20 cm^3
Alcohol absoluto	8 cm^3
Solución base	952 cm^3

Las soluciones se preparaban por separado, se esterilizaban al autoclave a 115° C. durante veinte minutos y después se ponían en las cantidades indicadas, asépticamente, junto con el alcohol.

Medio B

Manitol al 10 %	20 cm^3
Benzoato sódico al 1 %	20 cm^3
Alcohol absoluto	8 cm^3
Solución base	952 cm^3

La confección del presente medio la efectuábamos de igual forma que en el anterior.

Medio C

Manitol al 10 %	20 cm^3
Glucosa al 10 %	20 cm^3
Alcohol absoluto	8 cm^3
Extracto de suelo	100 cm^3
Solución base	852 cm^3

Utilizamos también, en menor escala, el medio Ashby, que confeccionábamos según las indicaciones de Salle (99).

En algunos casos también sustituíamos unas sustancias carbonadas por otras, en las proporciones que se indican.

El extracto de suelo lo preparamos según las indicaciones de Allen (4), como sigue:

"El extracto de suelo se prepara por calentamiento de 1.000 g. de tierra de jardín con 1.000 cm^3 de agua corriente, en el autoclave, a 120° C.

durante media hora. Se adiciona una pequeña cantidad de carbonato y la suspensión de suelo se filtra a través de papel de filtro doble. El filtrado, si es turbio, será purificado volviéndolo a filtrar hasta que llegue a estar completamente claro. Se envasa y esteriliza este extracto en cantidades de 100 cm^3.

Nosotros, además de las indicaciones de Allen, ajustábamos el pH después de la primera filtración a 7,2, si la solución de suelo filtrada difería de esta cifra.

Cuando el extracto de suelo iba a ser empleado para medios solidificados con agar-agar, no filtrábamos hasta una transparencia completa de este extracto.

Cuando utilizamos medios sólidos agregamos agar-agar en la cantidad del 2 por 100. En los medios con penicilina, que posteriormente describiremos cuando nos ocupemos de la obtención de las formas *L*, agregábamos tan sólo el 1,5 por 100 de agar-agar. La penicilina la agregábamos de una solución previamente preparada en agua estéril y de ésta tomábamos una cantidad suficiente para alcanzar la concentración de penicilina deseada para cada placa. Después de fundidos los tubos y enfriados a 45° C. añadíamos la penicilina y vertíamos rápidamente sobre las placas, agitábamos y enfriábamos éstas lo más rápidamente posible para evitar la alteración de la penicilina.

No utilizamos el gel de sílice para el aislamiento y purificación del *Azotobacter,* como propone Winogradsky, pues no presenta ninguna ventaja especial sobre el agar-agar y, por el contrario, es muy engorrosa su preparación. Este mismo autor recurre a los medios de agar-agar, para realizar una perfecta purificación del *Azotobacter.*

Como fuente de carbono utilizamos las tres sustancias descritas para cada medio. El utilizar varias fuentes de carbono tiene por objeto aislar un mayor número de razas de *Azotobacter,* pues como han demostrado Winogradsky (117), Jensen (47), y otros autores y hemos comprobado nosotros, hay razas que no metabolizan un determinado compuesto de carbono y no serían aisladas si casualmente fuese ésta la fuente de carbono utilizada en el medio como fuente de energía. Estamos de acuerdo con las ideas de Winogradsky de que en el suelo las sustancias que sirven de alimento al *Azotobacter* se encuentran muy diluidas y que, por consiguiente, un medio que imite las condiciones naturales debe reunir tal requisito, pero en cambio nos parece inadecuado

usar una sola sustancia carbonada como fuente de energía, como preconiza este autor, pues en el suelo, aunque muy diluídas, existen numerosas sustancias carbonadas, a la vez, que pueden ser utilizadas por el *Azotobacter*. A pesar de usar varias fuentes de carbono simultáneamente, no pensamos decir con ello que aislamos todas las estirpes de *Azotobacter* existentes en el suelo, pues incluso hay algunas que son incapaces de fijar el nitrógeno, como han demostrado Wyss (118) y otros autores.

No hemos utilizado para el aislamiento sustancias como la glucosa, manita, maltosa, etc., por ser éstas fácilmente utilizables por los mohos y otros microorganismos y de esta forma resultaría un medio menos selectivo para el *Azotobacter*, pues aunque este medio selectivo para este objeto no contiene nitrógeno, pueden desarrollarse algunos microorganismos al adquirir el nitrógeno combinado de diversas formas, tales como que el medio contenga algo de nitrógeno combinado con impurezas, que ciertos mohos puedan sintetizarlo (Morales (77) y, además, pequeñas cantidades de nitrógeno combinado son liberadas cuando se desarrolla el *Azotobacter*, y estas sustancias pueden ser aprovechadas por otros microorganismos. Por todo lo cual utilizábamos el medio A, que hemos descrito anteriormente, para efectuar los aislamientos.

Técnica de siembra

Para realizar el recuento partíamos de 1 g. de tierra. Como la muestra de suelo estaba húmeda, más aún en las muestras recién recolectadas, se averiguaba la pérdida de peso por desecación en otra porción de suelo húmedo y después referíamos la cantidad de *Azotobacter* equivalentè a 1 g. de suelo seco.

El gramo de suelo después de tamizado, era suspendido en 10 cm^3 de agua estéril, en un tubo de ensayo. Se sustituye el tapón de algodón por uno de goma estéril, se agita el tubo y se deja en contacto el suelo con el agua durante diez minutos, para que se verifique una perfecta hidratación y suspensión del mismo. Después de este tiempo se volvía a agitar, se dejaba reposar treinta segundos para que se depositasen las partículas más gruesas y se destapaba y se tomaba 0,5 cm^3 con una pipeta graduada de 1 ó 2 cm^3 de capacidad, pasando los 0,5 cm^3 a un tubo con 9,5 cm^3 de agua estéril, con lo que conseguíamos una dilución

al 1/20. Este tubo se tapaba con un tapón de goma como el anterior, se agitaba, y después de treinta segundos se pasaban 0,5 cm^3 a otro tercer tubo con 9,5 cm^3 de agua estéril y se conseguía una dilución de 1/400, y de forma análoga conseguíamos otro tubo con una dilución 1/8.000. Con estas diluciones, sembradas como luego describiremos, se conseguía normalmente contar las colonias y aislar las distintas especies y variedades; en los casos en que esto no era posible efectuábamos diluciones superiores. Las pipetas no eran enjuagadas en los líquidos de las diluciones, sólo eran vertidas. No utilizamos la técnica de Pochon (89) para preparar diluciones de tierra, porque cuando él la publicó nosotros teníamos muy avanzado el trabajo; difiere de la nuestra en que emplea primeramente un mortero donde hace previamente una disgregación del suelo y después pasa esta solución a un tubo, realizando una técnica para obtener las diluciones muy parecida a la nuestra.

La disgregación del suelo es muy posible que sea más completa por este procedimiento, pero quedan adheridas en el mortero numerosas bacterias, que se evitan o aminoran por el procedimiento nuestro. Nosotros hemos comparado las dos técnicas y nos dieron resultados paralelos.

También hay que tener en cuenta que las paredes de las pipetas pueden retener numerosas bacterias por adherencia, pues según Levergne (57) este valor puede oscilar entre un 5 y un 50 por 100 del valor total; nosotros, en este caso del *Azotobacter*, comprobamos un término medio de un 10 por 100.

Una vez conseguidas las diluciones como indicamos, las placas eran sembradas tomando con una pipeta de 1 cm^3, 0,15 cm^3 de la dilución a sembrar, que se depositaba en la placa correspondiente que contenía el medio que hemos designado por A. Seguidamente, con una pipeta Pasteur doblada en ángulo recto a modo de espátula de Drigalsky, extendíamos esta suspensión por la superficie de la placa. Este procedimiento permite que todas las colonias se desarrollen en la superficie y puedan distinguirse perfectamente unas de otras. En cambio, si se mezcla la dilución con el medio fundido a 45° C., por ejemplo, según el procedimiento usual, resulta difícil distinguir las colonias del interior del medio de impurezas, de colonias de mohos o de otros microorganismos, como igualmente es muy difícil contar las colonias cuando éstas se encuentran en distintos planos o unas encima de otras.

Cuando se trataba de aislar y purificar el *Azotobacter* de estas prime-

ras placas, tomábamos con el asa parte de una colonia y la suspendíamos en agua destilada estéril. De esta suspensión, pulverizábamos, con una pipeta Pasteur o un pulverizador, sobre una placa del mismo medio o de los otros medios que hemos descrito, procedimiento descrito por Winogradsky para la purificación. Este procedimiento reúne las dos técnicas de aislamiento clásicas en la Bacteriología, el procedimiento de los medios sólidos y el procedimiento de las diluciones.

Las placas las incubábamos normalmente a 27° C., algunas a la temperatura ambiente, pues según Petschenko (86), estas bacterias no degeneran a estas temperaturas, y de esta forma comparábamos los resultados.

El recuento de las colonias lo efectuábamos sobre una cuadrícula, como puede apreciarse en la figura 5, que contiene unos cuadros de 0,5 cm. y fondo negro, para de esta forma apreciar mejor las colonias, que suelen ser en un principio transparentes, aunque luego se vuelvan oscuras por la formación de pigmento. El recuento se hacía observando con el binocular a 30 aumentos.

La lectura se efectuaba a los ocho o diez días de hecha la siembra: un tiempo menor no permitía el desarrollo de todas las colonias, y mayor, tenía el inconveniente de que se podían desarrollar los mohos a expensas del nitrógeno fijado por estas bacterias y dificultar el recuento.

Los experimentos que presentaron resultados dudosos fueron repetidos.

Las aguas se analizaron tomando directamente de las muestras contenidas en frascos estériles 0,25 cm^3 y depositándolos en una placa con el medio A. Según los casos, sembrábamos igualmente placas con 0,25 cm^3 de diluciones al 1/10, 1/100, etc., según el porcentaje de *Azotobacter* que nosotros calculábamos podía tener.

Para hacer el recuento en estas placas sembradas de aguas, conviene iluminar por la parte inferior y de esta forma aprovechar la fluorescencia de las colonias y aumentar su visibilidad, ya que de otra forma está muy limitada por la transparencia y delgadez de estas colonias.

La purificación y aislamiento de las estirpes se efectúa de forma análoga a las sembradas con muestras de tierras.

En las muestras de aguas analizadas, cuando existía *A. agilis*, no se encontraban normalmente mohos, lo que nos hizo pensar en una antibiosis o algún factor de transformación de análogo efecto a los descritos por Socías (107-109), e intentamos su aislamiento, pero a pesar de

nuestros esfuerzos no logramos tal empeño, dada la complejidad química y biológica que representa un medio natural de este tipo.

Junto a las distintas especies de *Azotobacter* y a pesar de usar un medio lo más selectivo posible para esta bacteria, en las placas solíamos encontrar colonias de mohos, de actinomicetos y algún que otro microorganismo.

Los mohos eran los más frecuentes, pero sus colonias en general eran pequeñas, blancas y no llegaban en la mayoría de los casos a formar conidios, y si se las sembraba varias veces sucesivas en estos medios sin nitrógeno terminaban por no desarrollarse. Colonias de este tipo pueden verse en las figuras 5, 8 y 11, por ejemplo. Por el contrario, otras colonias de mohos, por lo general muy poco frecuentes, adquirían un gran desarrollo en estos medios sin nitrógeno, producían conidios abundantes y podían resembrarse varias veces en estos medios, lográndose un crecimiento relativamente abundante. Estos mohos eran más frecuentes en las muestras de suelo francamente ácidas y con algunos de ellos hicimos un trabajo sobre fijación de nitrógeno por estos microorganismos (Morales (77). Este tipo de mohos puede apreciarse en la figura 10.

Entre las actinomicetos, los más frecuentes eran los pigmentados, especialmente los que producían pigmentos amarillos o violetas; sus colonias eran pequeñas y por sucesivas resiembras en estos medios terminaban por desaparecer. Algunos de estos actinomicetos tenían un marcado poder antibiótico contra los mohos, como puede verse en la figura 8. Nosotros intentamos estudiar más a fondo esta antibiosis, pero nos encontramos con que en los medios propios de los *Actinomyces* perdían esta propiedad antibiótica y en los medios sin nitrógeno su crecimiento era muy pequeño, y además, en sucesivas resiembras terminaban por desaparecer, sin que hasta el momento hayamos encontrado un medio adecuado para este fin.

Resultados de los análisis

Analizamos en total 300 muestras de suelos y 100 muestras de aguas. Las muestras de suelos fueron elegidas como hemos dicho al principio; en todas ellas se determinó el pH en agua, como igualmente la cantidad de calcio en kilogramos por hectárea y la cantidad de materia orgánica en porcentaje. En cada muestra se determinó igualmente el número de

Azotobacter por gramos de tierra desecada, como describimos en las técnicas. Con todas las muestras de suelos se hicieron dos grupos: un grupo con todas aquellas muestras de tierra que habían sido recolectadas con una anterioridad desde dos meses hasta uno o dos años antes de ser analizadas microbiológicamente por nosotros, aunque las determinaciones químicas se hicieron a poco de ser recolectadas por el Instituto de Edafología, que fue quien nos las facilitó; el otro grupo, formado por muestras recolectadas por nosotros o que nos fueron enviadas rápidamente, fueron sembradas para ser analizadas microbiológicamente y analizadas químicamente en un tiempo inferior a veinticuatro horas.

En cada uno de estos dos grupos que acabamos de establecer reagrupamos los resultados de los análisis de estas muestras, según ciertos intervalos de pH, cantidad de calcio y materia orgánica. En el cuadro 1 se recogen los porcentajes de *Azotobacter* en relación con el pH de las muestras recogidas con cierta anterioridad a su análisis microbiológico. El cuadro 2 es similar al 1, pero corresponde a las muestras analizadas inmediatamente después de su recolección. De la misma forma, se recogen en el cuadro 3 los porcentajes de *Azotobacter* en relación con la cantidad de calcio existente en el suelo, reunidos en 8 subgrupos; dicho cuadro corresponde a las muestras recogidas con bastante anterioridad al análisis); y el cuadro 4 es semejante al 3, solamente que corresponde a las muestras analizadas inmediatamente a su recolección, como hemos dicho repetidamente. De la misma forma, los cuadros 5 y 6 dan los porcentajes de *Azotobacter* en relación con la materia orgánica, en las muestras recogidas y analizadas después de un cierto tiempo, en el primer caso, y analizadas inmediatamente, en el segundo caso.

Referente a las muestras de aguas, hicimos las mismas determinaciones que con los suelos; todas las muestras fueron recogidas por nosotros y analizadas inmediatamente en un tiempo inferior a veinticuatro horas.

En las aguas el único factor de los determinados que pudiera tener cierta influencia fue la cantidad de materia orgánica, cuyos resultados los exponemos en el cuadro 7. Las oscilaciones de pH de las muestras recogidas eran pequeñas y la influencia que pudieran ejercer sobre el mayor o menor desarrollo del *Azotobacter* era muy pequeña y enmascarada por otros factores más importantes. Las cantidades de calcio que puedan tener las aguas no ejercen una gran influencia al parecer, pues en

Cuadro 1

pH	Número de muestras ensayadas	Número de *Azotobacter*/g. de suelo		
		Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo
4,55 - 5,00	21	14.104	800	67.000
5,05 - 5,50	6	148.416	500	744.000
5,55 - 6,00	3	81.666	24.000	173.000
6,05 - 6,50	4	512.400	157.600	664.000
6,60 - 7,00	12	1.775.333	72.000	5.600.000
7,09 - 7,50	18	2.086.111	130.000	6.080.000
7,55 - 8,00	59	997.762	44.000	3.200.000
8,02 - 8,21	27	55.740	15.000	108.000

Cuadro 2

pH	Número de muestras ensayadas	Número de *Azotobacter*/g. de suelo		
		Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo
4,50 - 5,00	17	19.394	1.100	80.000
5,10 - 5,50	10	64.580	6.800	186.000
5,60 - 6,00	3	77.966	3.900	160.000
6,10 - 6,50	4	1.480.225	1.900	2.360.000
6,60 - 7,00	5	3.725.800	125.000	10.800.000
7,10 - 7,50	41	4.103.170	90.000	9.400.000
7,55 - 8,00	63	1.362.666	63.000	8.000.000
8,10 - 8,15	7	76.714	60.000	90.000

Cuadro 3

Cantidad de calcio en Kg./Ha.	Número de muestras ensayadas	Número de *Azotobacter*/g. de suelo		
		Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo
0 - 1	24	20.341	500	173.000
1,1 - 15	42	1.338.804	2.800	6.080.000
15,1 - 30	9	1.726.444	512.000	5.600.000
30,1 - 45	8	1.076.625	45.000	2.200.000
45,1 - 60	26	811.961	18.000	3.200.000
60,1 - 75	7	435.428	49.000	1.200.000
75,1 - 90	8	433.625	50.000	1.200.000
90,1	26	509.692	15.000	2.100.000

Cuadro 4

Cantidad de calcio en Kg./Ha.	Número de muestras ensayadas	Número de *Azotobacter*/g. de suelo		
		Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo
0 - 1	23	29.026	1.100	186.000
1,1 - 15	43	3.165.202	1.200	10.800.000
15,1 - 30	13	3.304.230	80.000	9.050.000
30,1 - 45	6	1.716.666	160.000	2.800.000
45,1 - 60	18	2.032.722	60.000	8.000.000
60,1 - 75	12	1.877.750	63.000	5.600.000
75,1 - 90	8	562.250	90.000	1.500.000
90,1	27	943.185	65.000	3.100.000

Cuadro 5

Materia orgánica en porcentaje	Número de muestras ensayadas	Número de *Azotobacter*/g. de suelo		
		Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo
0 - 1	28	1.278.310	16.000	3.000.000
1,01 - 2	58	1.002.155	18.000	6.080.000
2,01 - 3	33	708.181	44.000	2.300.000
3,01 - 4	3	1.050.000	500.000	1.600.000
4,01 - 5	2	626.833	500	1.512.000
5,01 - 6	2	5.100	3.200	7.000
6,01 - 7	7	21.914	1.200	60.000
7,01	17	18.658	800	157.000

Cuadro 6

Materia orgánica en porcentaje	Número de muestras ensayadas	Número de *Azotobacter*/g. de suelo		
		Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo
0 - 1	19	3.104.736	70.000	9.050.000
1,01 - 2	52	2.552.153	85.000	10.800.000
2,01 - 3	25	1.863.760	149.000	4.300.000
3,01 - 4	22	1.182.045	60.000	6.000.000
4,01 - 5	1	1.300.000		1.300.000
5,01 - 9	6	1.108.100	1.000	5.600.000
6,01 - 7	5	1.055.160	1.800	5.000.000
7,01	20	142.445	1.100	2.329.000

Cuadro 7

Materia orgánica en porcentaje	Número de muestras ensayadas	Número de *Azotobacter*/cm³ de agua		
		Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo
0 - 0,0045	40	8	0	180
0,005 - 0,01	13	206	0	320
0,015 - 0,02	5	765	65	3.200
0,025 - 0,03	2	475	150	800
0,035 - 0,04	2	10	0	20
0,045 - 0,05	12	1.433	0	3.200
0,055 - 0,06	7	144	0	650
0,065 - 0,07	12	3.004	0	14.500
0,075	7	3.981	0	12.500

el suelo el calcio puede actuar modificando el pH y ejerce una influencia indirecta, pero esta acción no es tan manifiesta en las aguas.

Los valores medios de los distintos cuadros han sido representados en las gráficas de las figuras 1-4.

En la figura 1 la línea de puntos representa los valores medios del cuadro 1 y la línea continua representa los valores medios del cuadro 2. Las gráficas de los dos cuadros se corresponden en general. Los valores del cuadro 2 vienen a ser aproximadamente dobles que los del cuadro 1, pero guardan la proporción. La gráfica se encuentra un poco inclinada hacia el lado alcalino y los valores máximos corresponden entre 7,00 y 7,50 en ambos casos. Aunque analizamos muestras de suelos muy ácidos o muy alcalinos, no encontramos en ningún caso muestras completamente ausentes de *Azotobacter*, aun cuando en algunos casos la proporción de esta bacteria fuera muy pequeña.

La figura 2 corresponde a los valores medios de los cuadros 3 y 4, que relacionan el porcentaje de *Azotobacter* con la cantidad de calcio existente en el suelo. La línea de puntos corresponde al cuadro 3 y la

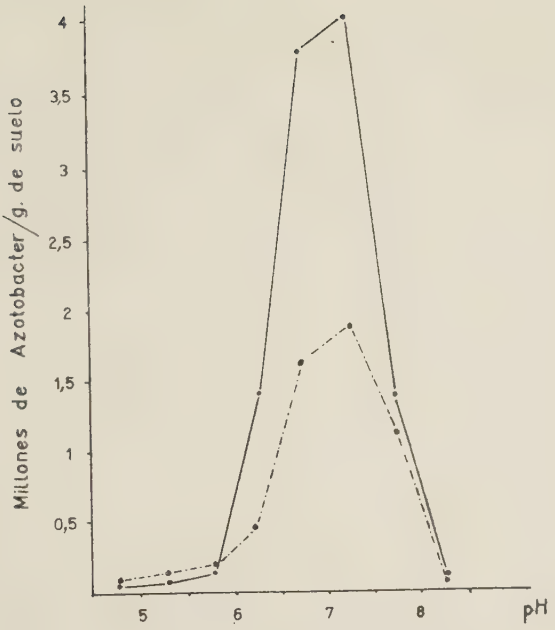


Figura 1

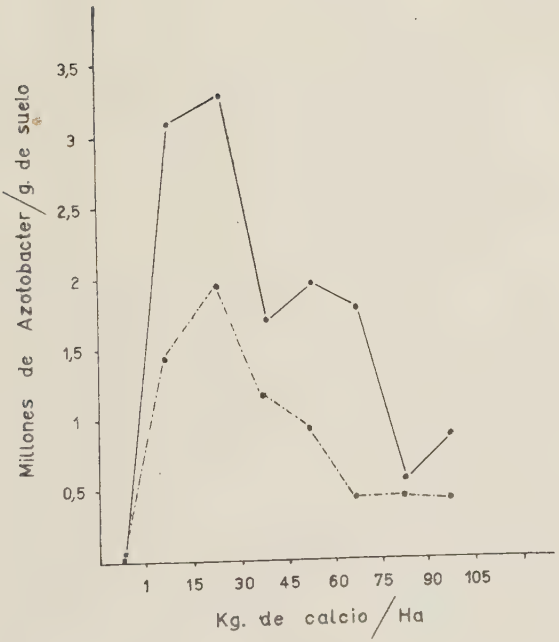


Figura 2

línea de trazo continuo corresponde al cuadro 4. Las dos gráficas se corresponden, en general. La correspondiente al cuadro 4 tiene dos valores inferiores a la cifra de *Azotobacter* que teóricamente debía corresponderle, y presenta dos inflexiones, que son el de 30,1 a 45 y el de 75,1 a 90 Kg/Ha., pero debemos tener en cuenta, si observamos el correspondiente cuadro, que el número de muestras ensayadas es muy pe-

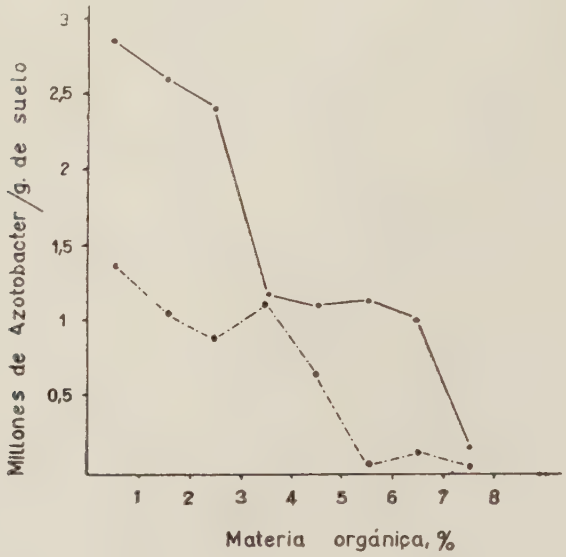


Figura 3

queño en estos valores de calcio (6 y 8 muestras, respectivamente), lo que puede interpretarse como causa de error por falta del número suficiente de datos.

De esta gráfica podemos deducir que el calcio se necesita en ciertas cantidades para un buen desarrollo del *Azotobacter;* los valores de 1 a 30 Kg/Ha. resultan ser los más favorables para el desarrollo de este microorganismo; los valores grandes de ion calcio resultan en cierto modo contraproducentes, pues estos valores corresponden a suelos alcalinos o de abundante yeso, con altas presiones osmóticas, que no son muy favorables para el desarrollo de esta bacteria. Como hemos indicado en el comentario de la gráfica anterior, los valores correspondientes

al cuadro 4 son aproximadamente dobles que los correspondientes al cuadro 3.

Finalmente, la figura 3 nos muestra la relación de los valores medios correspondientes a los cuadros 5 y 6, en las líneas de puntos y trazo continuo, respectivamente, y que representan las relaciones del porcentaje de *Azotobacter* con la cantidad de materia orgánica. Como en las gráficas anteriores, puede apreciarse que las dos líneas se corresponden en general y los valores de la correspondiente al cuadro 6 son muy superiores. Los porcentajes de *Azotobacter* van disminuyendo a medida que va aumentando la cantidad de materia orgánica; los valores máximos en el porcentaje de *Azotobacter* corresponden al valor mínimo de materia orgánica y viceversa.

Debemos tener en cuenta que el calcio, la materia orgánica y el pH del suelo guardan entre sí ciertas relaciones, que repercuten en los cuadros y gráficas que hemos consignado anteriormente. La materia orgánica es muy abundante en los suelos de tipo ácido y muy pequeña en los suelos de tipo neutro, por lo general, con abundancia de *Azotobacter* podemos explicar esta circunstancia, de una parte, porque la materia orgánica en abundancia acidifica el suelo por estar en general formando ácidos, por encontrarse comúnmente en plena descomposición de los saprofitos; el *Azotobacter*, en estos casos, no se desarrolla en abundancia, por incompatibilidad con la propia materia orgánica, por el pH desfavorable y por antagonismo con muchos saprofitos, como hemos podido comprobar en nuestro laboratorio. En los suelos neutros, el *Azotobacter* se desarrolla perfectamente y contribuye a la destrucción de la materia orgánica del suelo; como consecuencia de esto, hay abundancia de esta bacteria y disminución de materia orgánica.

Con respecto al calcio, ciertas cantidades de éste neutralizan el suelo y favorecen el desarrollo del *Azotobacter* y disminución de la materia orgánica, sobre todo las sustancias de tipo ácido, que son las consumidas por este microorganismo. Cantidades grandes de calcio aumentan la presión osmótica, pues corresponden a suelos salinos o de abundancia de yeso, por ejemplo, que no resultan muy favorables para el desarrollo de esta bacteria, ni en general para los microorganismos y plantas. Los suelos alcalinos pueden experimentar un cierto aumento de la cantidad de materia orgánica por disminución de la flora bacteriana, no sólo de *Azo*

tobacter, sino de otros tipos, por las condiciones poco favorables de desarrollo de las mismas. Referente a las aguas analizadas por nosotros, solamente la cantidad de materia orgánica parece guardar cierta relación con el porcentaje de *Azotobacter.* En el cuadro 7 consignamos las relaciones de las muestras analizadas de materia orgánica y cantidad media de *Azotobacter,* como igualmente la muestra que dentro de la misma cantidad de materia orgánica dió un porcentaje máximo y la que le dio mínimo. En la figura 4 podemos apreciar que la cantidad de *Azotobacter* en general va aumentando con la cantidad de materia orgánica, precisa-

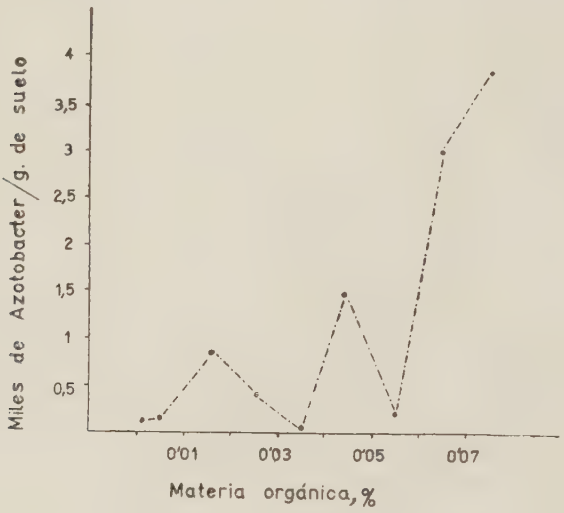


Figura 4

mente al contrario que ocurría con las muestras de suelo, pero hemos de tener en cuenta que las cantidades máximas de materia orgánica encontradas en las aguas coinciden casi con las cantidades mínimas de materia orgánica en las muestras analizadas de suelos. En la gráfica se aprecian algunas anomalías muy acusadas, que coinciden con grupos que tenían un número muy pequeño de muestras para analizar. En el cuadro también puede apreciarse que existen muchos mínimos de cero, y ello es debido a que en algunas aguas, aunque a primera vista pudieran contener *Azotobacter,* éste no existe por diversas razones; por ejemplo,

nosotros hemos podido comprobar en todos aquellos estanques o charca· que se encontraban en putrefacción, que no existía *Azotobacter,* aunque el agua contenga materia orgánica y otras características favorables para el desarrollo de esta bacteria.

Nosotros hemos comprobado, además, que el *Azotobacter* es tanto más abundante cuanto más cerca se encuentra de la superficie del suelo, llegando a un máximo hacia los 2 cm. de la misma y volviendo luego a decrecer.

Influye también el grado de aerobiosis del suelo y la humedad en grado medio.

El *Azotobacter agilis* era más abundante en las aguas en que existía vegetación de plantas acuáticas, en general.

SOBRE LA DISTRIBUCION DEL *AZOTOBACTER* EN SUELOS DE OTROS PAISES

En Italia, Perotti (84) estudia la distribución de esta bacteria en los suelos de su país; De Rosi (20) hace un trabajo sobre este mismo género, tratando la fijación en los distintos suelos italianos. Entre los autores rusos, Souchkina (110) averigua que los suelos de podsol son nefastos para el *Azotobacter;* Michoustine (72) llega a la conclusion en sus trabajos de que deben usarse procedimientos por extensión para aislar el *Azotobacter,* pues de lo contrario no logra aislarse de los suelos muy pobres; Manteifield (70) trata de la distribución de este organismo en las estepas rusas, en relación con la profundidad, concentración de sales, temperatura y concluye que también depende del estado en que se encuentre la madera caída de los bosques de roble, y, finalmente, Polianske (92) se ocupa de la eficacia del *Azotobacter* en los suelos. En Francia, Duochanfour (30) estudia los suelos forestales y determina el número de bacterias, de mohos y de *Actinomyces;* Pochon (89) trata de la microbiología de las turberas ácidas, no encontrando *Azotobacter* en estos lugares, lo que constituye una auténtica excepción, pues el *Azotobacter* suele encontrarse en la mayoría de los terrenos. Petersen (85), en Dinamarca, averigua las relaciones de estos gérmenes con el medio ambiente. Derx (21) determina la distribución del género *Beijerinckia,* próximo al

Azotobacter, en los suelos tropicales de la India y Java. El género *Azotomonas* se ha aislado de cáscaras de frutos y de algodón que se encontraban en fermentación. Kluyver (55) hizo notar que el *Azotobacter agilis* sólo se podía aislar de las aguas.

ESPECIES Y VARIEDADES AISLADAS

En todos los suelos estudiados, nosotros hemos encontrado en mayor o menor proporción el *Azotobacter*, no así en las aguas, como ya hemos citado anteriormente. También lo aislamos de unas soluciones de taninos, en el curso de unos trabajos que realizamos sobre estas sustancias y su bacteriología (Morales (76). Solamente hemos encontrado una cita de Pochon (91), en la que indica que no le ha sido posible el aislar este género de unos suelos de turberas francamente ácidos, en los cuales abunda preferentemente la desnitrificación. Blinkov (9 y 10) aisla normalmente esta bacteria de suelos ácidos y considera que estas estirpes tienen características especiales, que les permiten vivir en dichos suelos.

Para la clasificación hemos consultado el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (séptima edición) (6), que incluye a estos organismos en la clase Esquizomicetos (Nägeli), orden Eubacteriales (Buchanan), suborden *Eubacterineae* (Breed, Murray e Hitchens), familia III *Azotobacteriaceae*, género único *Azotobacter* (Beijerinck), especie típica *Azotobacter chroococcum* (Beijerinck) y dos especies más, el *Azotobacter agilis* (Beijerinck), y el *Azotobacter indicum* (Starkley y De). Incluye un apéndice con el género *Azotomonas* (Stapp), especie única *Azotomonas insólita* (Stapp).

La clasificación que hemos seguido realmente es la de Jensen (47), muy parecida a la del Bergey, que además la siguen la mayoría de los autores modernos. Este autor, en su extenso trabajo sobre el *Azotobacter*, hace un estudio crítico-bibliográfico de la taxonomía de *Azotobacteriaceae*. Admite el género *Azotobacter*, el género *Beijerinckia* y, en un apéndice, el género *Azotomonas*. Para el primer género, este autor describe 4 especies: *Azotobacter chroococcum, Azotobacter agilis, Azotobacter beijerinckii* y *Azotobacter vinelandii*. Para el segundo género admite dos especies: *Beijerinckia índica* y *Beijerinckia lacticógenes*, y para el tercero la especie única *Azotomonas insólita*.

La familia *Azotobacteriaceae,* Jensen la describe:

"Células de considerable variación, en tamaño y forma, no forman endosporas, generalmente móviles por medio de flagelos laterales. Gram-negativas, a veces con tendencia a la reacción positiva. Aerobios obligados, que oxidan numerosos compuestos de carbono, alcoholes y ácidos orgánicos hasta dióxido de carbono y agua. No se forma gas. Algún género forma ácido de la glucosa. Crecimiento pobre en los medios con peptona y un azúcar. No actividad proteolítica. Crecen mejor sin nitrógeno en el medio o compuestos simples de nitrógeno en el medio: amoníaco, urea y, como norma, nitrato."

El género *Azotobacter,* le define:

"Bacilo grande, células ovales o cocoides. Considerable pleomorfismo, particularmente en medios con nitrógeno combinado, frecuentemente células maduras presentan una gruesa pared celular (quistes). Crecimiento rápido, con oxidación del substrato a dióxido de carbono y agua. No crecen sin nitrógeno en el medio por bajo de un pH de 4,5 a 5,0, y raramente por bajo de un pH 6,0."

A continuación este autor hace un estudio crítico bibliográfico de las especies del género, que son aproximadamente las del "Bergey", menos el *Azotobacter indicum.* Propone la siguiente clave de especies:

A) Organismos débilmente móviles o inmóviles, forman pigmentos amarillos insolubles o pardos. Habitantes típicos del suelo.

a) Móvil, pigmento a la luz pardo oscuro: *A. chroococcum.*

b) Inmóvil, pigmento amarillo o carente: *A. beijerinckii.*

B) Organismos muy móviles, formando pigmentos solubles verde-amarillentos o púrpuras. Algunas veces, no. Habitantes típicos del agua.

a) Células de forma bacilar, formando quistes: *A. vinelandii.*

b) Células muy grandes, ovales o redondas, no quistes: *A. agilis.*

Como hemos dicho anteriormente, Jensen admite el género *Beijerinckia,* con dos especies, la descrita por Starkey y De como *Azotobacter indicum,* y la descrita por Kauffman y Toussaint como *Azotobacter lacticógenes.* El nombre de *Beijerinckia* fue propuesto por Derx.

Jensen describe el género:

"Difiere morfológicamente de otros *Azotobacter* por el pequeño tamaño de sus células (las cuales tienen una inclusión polar grasa), y fisio-

lógicamente, por su lento crecimiento y copiosa formación de una mucosidad tenaz, pero particularmente por su habilidad de fijar el nitrógeno en un margen de pH de 3 a 9. El organismo es móvil por medio de flagelos laterales, de acuerdo con Hofer (45), pero no forma quistes. Un pigmento pardo-rojizo insoluble aparece en cultivo de agar, y parece se forma un ácido durante su crecimiento. La fijación del nitrógeno, aunque lenta, es muy eficiente y puede exceder de 20 mg./g. de sacarosa consumida. El amoníaco y el nitrato (este último como acumulación de nítrito) son usados en más alta proporción que cuando no tiene nitrógeno en el medio."

Este autor propone para el presente género la siguiente clave de especies:

a) Móvil, crecimiento sobre agar muy tenaz: *B. índica.*

b) No móvil, crecimiento en agar pastoso: *B. lacticógenes.*

Describe la ecología de este nuevo género en países tropicales, como la India, Java, etc.

El nombre de *Azotomonas* fue propuesto por Orla Jensen para sustituir el nombre de *Azotobacter,* pero el cambio no tuvo fortuna y se emplea para designar unos microorganismos parecidos, situados en un apéndice a las Azotobacteriáceas. Los *Azotomonas* fueron descritos por Stapp, que los aisló de una mezcla de cáscaras de arroz y cáscaras de fruto de algodón. Se diferencian de los *Azotobacter* y de los *Beijerinckia.* Poseen propiedades fermentativas; un flagelo polar produce indol, fermentan muchos carbohidratos con producción de ácido y gas. Tienen muchos parecidos con las Pseudomonadaceas, por lo que Jensen propone que no deben estar unidos a los *Beijerinckia* y a los *Azotobacter.*

No todos los autores están de acuerdo con la clasificación anterior; por ejemplo, Petschenko (86) es partidario de la especie única y considera al *Azotobacter agilis* como una variedad adaptada al medio acuático.

De todas las especies establecidas por los distintos autores solamente el *Azotobacter chroococcum* y el *Azotobacter agilis,* que fueron inicialmente descritas por Beijerinck, se mantienen claramente distintas; las demás especies que se citan en el "Bergey" y en el trabajo de Jensen se pueden considerar en muchos casos como una variante de una de estas dos especies.

Nosotros, en el curso de nuestros estudios, como describiremos a continuación, hemos podido comprobar que las especies *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter beijerinckia,* de una parte, y las especies *Azotobacter agilis* y *Azotobacter vinelandii,* de otra, representan estados límites de una serie continua de variedades, que tienen caracteres intermedios entre estas dos especies.

Tipos de colonias

Las colonias de *Azotobacter chroococcum* recién aisladas eran lisas, brillantes, transparentes, de bordes perfectamente lisos, como puede apreciarse en las figuras 11 y 14 e igualmente en la figura 6, correspondiente a una placa, y en algunas figuras siguientes. Estas colonias, por lo general, no contenían pigmentos, por lo que había que clasificarlas según el "Bergey's Manual" (6) y Jensen (47) como pertenecientes al *Azotobacter beijerinckii;* no obstante, según Jensen y otros autores, el *Azotobacter chroococcum* no produce pigmento nada más que cuando está expuesto a la luz y tiene presente en el medio pequeñas cantidades de cobre que actúan como oligoelemento, y si le cultivamos en el interior de la estufa se encuentra privado de la luz. Cultivándole a la temperatura ambiente y en presencia de luz, el número de colonias pigmentadas es mayor, pero no alcanzan el ciento por ciento de las que aparecen con estas características y otras distintivas de las dos especies; llegamos a la conclusión de que coexisten estas dos especies en los suelos en mayor o menor abundancia cada una de ellas, según la muestra que se considere. En la figura 14 se puede apreciar cómo aparece el pigmento en estas colonias, por la pérdida de transparencia y de la superficie brillante de las mismas.

En la muestra 211 aislamos una estirpe que producía un pigmento verde oscuro, no fluorescente, que no utilizaba la glucosa y tenía otra serie de características particulares que no hemos encontrado descritas para ninguna variedad. En las muestras 182, 193 y 260 hemos aislado un microorganismo que, en el medio A, donde nosotros realizábamos el aislamiento, tenía color amarillo rosado muy tenue, pero cultivado en agar común producía un pigmento rojo intenso, no fluoresecente ni difusible en el medio. Del agar común, estas bacterias podían resembrarse en el medio A, y volvían a crecer y a producir el pigmento amarillo te-

nue, como dijimos al principio. El tamaño es algo más pequeño que el del *Azotobacter chroococcum*. Con esta estirpe hemos obtenido las formas *L*, por los mismos procedimientos que en las otras especies, como describimos en los capítulos siguientes.

Nos concretamos a lo expuesto sobre estas variedades no descritas y no consideramos aquí estas estirpes como nuevas especies, porque dada la enorme variedad de formas que en el *Azotobacter* pueden presentarse hay que tomar muchas precauciones para describir una nueva especie, pero sí debemos consignar, al menos, que esta variedad no ha sido citada por ningún autor.

En los *Azotobacter* aislados de aguas, los tipos de colonias son mucho más variados. Si las aguas son de acequias de riego, pequeños charcos, etc., como es lógico se comportan como si fueran suspensiones de suelo y se aislan el *Azotobacter chroococcum* y el *Azotobacter beijerinckii*. Si se trata de aguas estancadas o en putrefacción, no se encuentra ningún *Azotobacter*, y si las aguas son de sitios donde la vegetación acuática es abundante, tanto en algas como en otros vegetales, el *Azotobacter agilis* y el *Azotobacter vinelandii* se suelen dar con frecuencia.

Las colonias recién aisladas eran extendidas, y algunas muy extendidas, que alcanzaban en los medios B y C 1 cm. de diámetro en cuatro o cinco días; otras eran menos extendidas y más levantadas sobre el medio. Las más extendidas eran finísimas y muy difíciles de ver, a no ser por la fluorescencia, propiedad que todas las colonias, al aislar, poseen. La fluorescencia ha sido estudiada por Jonstone (48 y 49), quien, en el último de los trabajos, estudia la posibilidad de una clasificación atendiendo a la fluorescencia; este autor sostiene que cuando las estirpes o especies de *Azotobacter agilis* y de *Azotobacter vinelandii* se iluminan con una luz de 3.600 Å, la primera tiene fluorescencia blanca y la segunda fluorescencia verde. Estudia también químicamente dichos pigmentos y comprueba que están formados por proteínas y que los dos pigmentos tienen un aminoácido común, que es la lisina.

Nosotros hemos visto que la movilidad, fluorescencia y tamaño de los individuos varía gradualmente desde las estirpes típicas de *Azotobacter agilis* hasta las estirpes típicas de *Azotobacter vinelandii*. Lo mismo ocurre con los tipos de colonias. La figura 12 muestra dos colonias de *Azotobacter vinelandii* sobre medio B, que presentan una intensa fluores-

cencia azul-verdosa por transparencia a la luz natural. La figura 17 representa dos colonias de *Azotobacter agilis,* las cuales han sido fotografiadas muy jóvenes, o sea, al principio de su crecimiento; los bordes de estas colonias suelen ser casi lisos o más o menos dentados, la fluorescencia es azul o azul-verdosa, con muy poca cantidad de verde. En la misma fotografía se aprecian varios tipos de colonias; las más levantadas y redondas corresponden al *Azotobacter chroococcum,* que no es propiamente habitante de las aguas. Las figuras 13, 16, 19 y 20 representan bordes de distintas colonias, y en ellas puede apreciarse cómo son gradualmente más extendidas y finas. Además, cuanto menos extendida, la fluorescencia es más verde. El borde de las colonias es sumamente irregular y no característico, como puede apreciarse en las fotografías citadas; para una misma colonia, el aspecto del borde puede cambiar mucho durante su crecimiento, como puede apreciarse en algunas de dichas fotografías. Las figuras 15 y 18 representan dos colonias jóvenes de *Azotobacter agilis.*

Discusión de las especies

De nuestras observaciones se deduce que, de una parte, existen dos especies claramente diferentes; son las creadas por Beijerinck en 1901, el *Azotobacter chroococcum* y el *Azotobacter agilis,* y que son realmente admitidas por el "Bergey's Manual". Otra especie, el *Azotobacter indicum,* nosotros no la hemos aislado ni estudiado por ser propia de suelos tropicales. Jensen, y con él gran número de los autores modernos, admiten además las especies *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter beijerinckii,* que fueron creadas por Lipman en 1903 y 1904, y pueden considerarse en cierto modo como variedades de *Azotobacter agilis* y *Azotobacter chroococcum,* respectivamente, pues sus diferencias no son claras en las estirpes intermedias, y solamente en las estirpes muy diferenciadas se distinguen por el tamaño, producción de quistes y fluorescencia, aspectos muy variables todos ellos en este género. A pesar de lo dicho, nosotros seguiremos hablando de las cuatro especies, por ser una cuestión universalmente admitida y de esta forma poderse entender más fácilmente.

Otras muchas variedades que comenta el "Bergey's Manual", como igualmente otras citadas por Jensen y otros autores, son poco sostenibles.

Citología

La citología la hemos revisado detenidamente y muchas de las formas que más o menos confusamente han descrito diversos autores, especialmente los pleomorfistas, las citaremos en el capítulo correspondiente a las formas *L* de esta bacteria.

Los quistes, descritos por Winogradsky, pueden apreciarse en la figura 26, así como también el estado prequístico en la figura 28; en la figura 23 se aprecian los pequeños quistes, también descritos por Winogradsky, y, finalmente, en la figura 29, se aprecia claramente la cápsula de algunos momentos del desarrollo; todas estas fotografías corresponden al *Azotobacter chroococum*. Además de estas formas, nosotros hemos observado otras redondeadas, bacilares, etc., que describiremos al hablar del ciclo en los medios pobres, de esta bacteria.

Algunos autores, como Bisset (7 y 8), estudian extensamente la citología de esta bacteria. Este autor describe los gonidios, que observa con el microscopio electrónico, y ve que están formadas por unos bacilos pequeños con flagelos lofotricos. Para nosotros, son seguramente formas intermedias del ciclo *L*. Se ocupa también de los llamados simplasmas, que volveremos sobre ello al hablar de las formas *L*. El presente autor también estudia la cápsula, formas de resistencia y pared celular. Determina la resistencia del *Azotobacter* al calor y averigua que estas formas son capaces de sobrevivir cinco minutos a 85° C., lo cual es una prueba evidente de su resistencia a las altas temperaturas, pues las formas vegetativas no soportan en ningún momento dichas temperaturas. Otras estirpes llegan a resistir cinco minutos a 95° e incluso 100° C., según el presente autor. Nosotros hemos comprobado tal extremo, y desde luego pueden soportar la temperatura de 85° C. durante cinco minutos, pero no hemos encontrado ninguna estirpe que resista más altas temperaturas. También se ocupa este autor del comportamiento similar de las endosporas de *Bacillaceae* con los quistes de *Azotobacter*, cuando se les trata con ácido nítrico, el cual hace salir el protoplasma en las esporas de *Bacillaceae* y en *Azotobacteriaceae*, de igual manera. Esto le sirve de argumento para comparar el parentesco de estas dos familias. En cuanto a la pared celular, este autor considera que se origina por crecimiento hacia el interior, pero las pruebas que presenta no son concluyentes, por-

que como toda fotografía de una cuestión dudosa y difícilmente observable, tiene mucho de interpretación subjetiva. Estas ideas son contrarias a las de Knaysi (56) para todas las bacterias, en general, y el *Azotobacter* en particular, fundándose en razonamientos parecidos. Nosotros hemos repetido estas tinciones y no hemos conseguido imágenes lo suficientemente claras para inclinarlos en un determinado sentido.

El citoplasma de esta bacteria ha llamado, desde los primeros tiempos, la atención por la gran cantidad de vacuolas, granos de volutina y de grasa que en él pueden presentarse. Fueron estudiados por Bonazzi (11) en 1915. Los lípidos los hemos puesto de manifiesto con la técnica de Burdon (12) y los hemos distinguido de los fosfolípidos utilizando la técnica de Menschik (71); el contenido en lípidos y fosfolípidos varía extraordinariamente, según el momento de desarrollo y el medio de cultivo que se emplee.

El núcleo en este género fue estudiado por varios autores antiguos que comenta Floethmann (37). Este autor, en trabajos modernos, considera que el *Azotobacter* contiene normalmente 4 corpúsculos coloreables por el reactivo de Feulgen, cuyos corpúsculos coinciden con los que se obtienen usando la técnica de Robinow. Utiliza, además, una coloración nuclear *in vivo*, conseguida con el colorante naranja de acridina, cuya coloración tiene una etapa previa en la que determina la toxicidad del colorante para la estirpe estudiada, y posteriormente utiliza concentraciones inferiores a las cantidades tóxicas. Con este colorante consigue distinguir el autor las bacterias vivas de las muertas, pues las bacterias vivas absorben unas 40 veces menos colorante que las muertas. En sus trabajos cultiva los microorganismos en medio de Asbhy, tomado de Salle (99).

Eisenstark (32 y 33) se ha ocupado también modernamente del núcleo, utilizando la coloración de Robinow, el microscopio de fase y el microscopio electrónico. Como medio de cultivo emplea el de Asbhy. Los estudios los realiza sobre *Azotobacter agilis*, a diferencia del autor anterior, que los realiza con el *Azotobacter chroococum*. Este autor llega a la conclusión de que el núcleo de esta bacteria, en los primeros estados del desarrollo, presenta unas masas de gran afinidad por los colorantes nucleares, que se encuentran situadas en los extremos de los bacilos. Las

imágenes, según este autor, coinciden en los tres procedimientos por él empleados.

Pochon (89) se ocupa también del núcleo de *Azotobacter*, que tiñe según la técnica de Robinow, y llega a la conclusión de que el núcleo de estas bacterias se presenta como una forma discreta en el centro de las mismas.

De lo anteriormente expuesto, deducimos que no están de acuerdo referente al núcleo del *Azotobacter*. Hay que tener en cuenta las dificultades que presenta este microorganismo para su estudio nuclear, como por ejemplo, su pleomorfismo, variabilidad enzimática, que supone cambios en su composición protoplasmática, etc. Nosotros hemos estudiado el núcleo de algunas de sus formas *L*, que describimos más adelante.

Los flagelos en Azotobacter

Han hido descritos de muy diversas maneras, según los distintos autores. Beijerinck (5), en 1901, describió el *Azotobacter chroococcum* como monotrico con un flagelo polar. Petschenko (86) le describió como peritrico en 1930. El *Azotobacter agilis* le considera Beijerinck, en 1901, como monotrico, y Lohnis y Waterman (65), en 1908, son de la misma opinión que el anterior. Winogradsky (117), en 1938, le considera primeramente como monotrico y posteriormente como lofotrico. Lohnis y Smith (69), en 1923, ya le consideran unas veces como monotrico y otras como peritrico. Jones (50), en 1913, le considera como peritrico y tiene la misma opinión que tenía Petschenko, y finalmente, Zettow (119), le ha descrito como lofotrico.

Nosotros hemos coloreado los flagelos con el método de Leifson (60) y de Fischer (36), además de las técnicas corrientes de la coloración de flagelos. La tinción de los flagelos siempre es difícil, pero en este caso las dificultades se acrecentan por el pleomorfismo que presenta la bacteria y la labilidad que tienen los flagelos. Esto ha motivado la gran confusión que sobre esta materia han tenido los distintos autores y que solamente el microscopio electrónico ha podido resolver, poniendo de manifiesto los flagelos con cierta seguridad.

Hofer (45) ha estudiado modernamente los flagelos en distintas estirpes de *Azotobacter*. Emplea la técnica de coloración de flagelos de

Gray, modificada por Hofer y Wilson; el colorante lo filtran por berkefeld, y después por papel. Con este procedimiento los autores demuestran que todos los *Azotobacter* son peritricos. Además, estos autores estudian los flagelos de esta bacteria con el microscopio electrónico, único procedimiento seguro para conseguir ideas claras, y concluyen que todos los *Azotobacter* son peritricos con un número de flagelos que oscila de 30 a 50 por célula, y cuyos flagelos tienen un tamaño de unas 10 milimicras por término medio. Terminan haciendo un estudio crítico de las técnicas empleadas por los anteriores investigadores, y concluyen que los procedimientos de coloración empleados no eran adecuados para estas especies.

Bacteriófago de Azotobacter

Monsour y colaboradores (80) han aislado del suelo un fago que es capaz de lisar el *Azotobacter vinelandii,* pero no es capaz de lisar el *Azotobacter agilis.* Este fago presenta todas las características de otros fagos descritos para muchas bacterias y los autores ven en él grandes posibilidades para la clasificación de especies, estudios de la biología de este género, etc.

No han aislado, por el contrario, ningún fago para el *Azotobacter chroococcum,* aunque lo han intentado.

A nosotros nos parece muy extraño que no se encuentre ningún fago para el *Azotobacter chroococcum,* siendo que éste es el habitante normal de los suelos y, en cambio, exista para el *Azotobacter vinelandii,* cuyo medio normal son las aguas. A no ser que la ausencia de *Azotobacter vinelandii* en los suelos sea debida a la existencia de estos fagos. En el curso de nuestros trabajos no hemos encontrado indicios que nos hagan sospechar la existencia de fagos para estas bacterias.

Aspecto biofísico

La temperatura de desarrollo es muy amplia en estas bacterias, pueden crecer desde 10° hasta 40° C., pero esta cifra no quiere decir que sea su temperatura óptima, pues según Petschenko (86), las temperaturas más bajas producen un crecimiento muy normal en *Azotobacter,* y no se originan las formas que han llamado de involución y no degenera la especie por cultivo.

La presión osmótica influye poco sobre esta bacteria. Blinkov (9) ha demostrado que en los suelos rusos existen estirpes capaces de soportar las grandes presiones osmóticas de grandes concentraciones salinas. En nuestros trabajos hemos aislado el *Azotobacter* de suelos salinos y yesosos que contenían una gran cantidad de sales, y en el laboratorio seguían creciendo estas estirpes, aunque se añadiese un 2 por 100 de cloruro sódico.

Goucher y colaboradores (39 y 40) averiguan el efecto de la luz sobre este género y en el último de los trabajos citados se ocupan del efecto de la luz ultravioleta.

Shirley (102) observa el efecto de los rayos X sobre el *Azotobacter agilis.*

La curva de crecimiento ha sido estudiada en este microorganismo por Gayney (38), en cuyo trabajo hace un estudio crítico de los métodos indirectos para contar bacterias cuando se aplican a este género. Utiliza la medida de la turbidez, medida del volumen celular (que obtiene por centrifugación de una cierta cantidad de medio de cultivo, recogiendo el precipitado sobre tubos graduados), incremento del pH, consumo de sales amónicas, fijación del nitrógeno, etc. Concluye que los métodos indirectos pueden ser aplicables en algunos casos para la determinación de la curva de crecimiento en esta bacteria, pero no tienen una aplicación general, como ocurre en la mayoría de las otras bacterias, debido a la falta de uniformidad de tamaño de las distintas formas de *Azotobacter,* que hace que no den siempre los mismos valores para un mismo número de bacterias. También influyen, según este autor, las dificultades de crecimiento, que hacen que estas técnicas no sean de aplicación general

Este autor estudió por una técnica parecida la curva de crecimiento de esta bacteria a pH diferentes. Determina los máximos, mínimos y óptimos a que esta bacteria puede desarrollarse. Comenta el trabajo de Burk (13), que fija el límite de pH entre 3 y 4. También hace referencia a Starkey (105), que señala como límite inferior un pH 3 para una estirpe de *Azotobacter indicum* o *beijerinckii.* Otros varios autores que han estudiado el *Azotobacter,* opinan que a pH 6 cesa el crecimiento. Gayney, en el citado trabajo, opina, según sus observaciones, que los *Azotobacter* a pH 4,5 tienen crecimiento si el medio contiene nitrógeno fijado. En medios sin nitrógeno, a un pH de 6, la respiración disminuye

grandemente. El crecimiento entre pH de 5,5 y 6 suele ser muy corriente para un gran número de estirpes. La determinación del crecimiento la hace el citado autor averiguando la glucosa consumida, el amoníaco absorbido, medida de la turbidez y medida del volumen celular, según los casos. Cuando los medios contienen nitrógeno combinado, en una cantidad pequeña para iniciar el crecimiento en un principio, éste continúa, después de agotado el nitrógeno, a un pH más bajo que el que correspondería a medios desprovistos de nitrógeno.

Jensen (47) llega igualmente a la conclusión de que el *Azotobacter* puede crecer a un pH bajo, pero la fijación del nitrógeno, por lo menos en el laboratorio, es entonces muy dudosa.

Blinkov (10) describe que hay estirpes que crecen a pH bajo, hasta pH 5, y en el laboratorio se desarrollan bien de 27° a 30° C., y la fijación del nitrógeno resulta ser intensa.

Fedorov (35) encuentra que el cultivo prolongado en los podsoles, suelos muy ácidos, termina haciendo perder enzimas a los *Azotobacter*, y éstos se vuelven atípicos.

En el curso de nuestro trabajo hemos podido observar que, en efecto, en los medios sin nitrógeno y de composición muy simple, las estirpes de este género, por lo general, no se desarrollan a pH bajo. Pero si el medio no es tan pobre y contiene, por ejemplo, un 10 por 100 de extracto de suelo, o lo que es lo mismo, contiene algo de nitrógeno combinado y algunas sustancias y oligoelementos indispensables para esta bacteria, el crecimiento y fijación se logran a pH 5 perfectamente. En las muestras de suelos de pH 5 y menos, hemos aislado el *Azotobacter* en todos los casos, aunque sea en menor proporción que en los suelos neutros. También hemos de tener en cuenta que las experiencias del laboratorio no pueden aplicarse de una manera sistemática a lo que debe de ocurrir en el suelo; por ejemplo, Hely (44) averigua que la fijación del nitrógeno aumenta en algunos casos cuando el *Azotobacter* crece en simbiosis con ciertos *Actinomyces*. Por otra parte, las formas *L* de esta bacteria, como ocurre con todas las formas *L* en general, son más resistentes que las formas normales para ciertos pH y otras condiciones, y pueden desarrollarse y fijar el nitrógeno en aquellos sitios en que las formas normales no puedan desarrollarse.

Aspecto bioquímico

La actividad bioquímica de este género ha preocupado desde el primer momento a muchos investigadores. Existen numerosos estudios sobre la capacidad de utilizar diversas sustancias como fuente de energía y han llegado a la conclusión de que puede utilizar sustancias muy diversas, como alcoholes, ácidos orgánicos, sales de estos ácidos, glícidos, entre los que se encuentran monosacáridos, disacáridos y polisacáridos; compuestos cíclicos, como el ácido benzoico y salicílico, entre otras sustancias. Pero hay determinadas estirpes que no fermentan algunas de estas sustancias, aunque ellas muy frecuentemente sean fermentadas por otras, incluso es frecuente que estirpes que fermentan perfectamente una sustancia pierdan esta propiedad de súbito en el laboratorio. El *Azotobacter chroococcum*, como ha determinado Winogradsky, no crece a veces sobre el acetato o benzoato, etc. Smith (104) encuentra estirpes de *Azotobacter chroococcum*, que no fermentan, o sea, no utilizan el manitol. El *Azotobacter chroococcum* tiene, como ha demostrado Harris (43), manitol-deshidrogenasa, y la pérdida de esta enzima puede motivar el no poder utilizar esa sustancia.

El poder enzimático del *Azotobacter* es muy grande y ha sido muy estudiado, especialmente en el *Azotobacter vinelandii*. Wilson (116) estudia el poder de óxido-reducción del *Azotobacter vinelandii*. Williams (115) estudia la adaptación del *Azotobacter* a los medios con ácido tricarboxílico por esta bacteria. Repaske (94) obtiene por diálisis un fermento, la succino-deshidrogenasa, del *Azotobacter vinelandii*. Alexander (3) estudia las enzimas de la fermentación del ácido tricarboxílico. Daste (16) averigua la acción simultánea del almidón y la colofonia sobre este género. Mortenson (78) estudia la disimilación de los compuestos fosforados en los primeros estados de la utilización de los carbohidratos. Goucher (39 y 40) averigua la fotorreactivación del *Azotobacter* en relación con la reactividad de estas bacterias frente a diversos compuestos.

Por el contrario, tienen muy poca actividad proteolítica, y altas concentraciones de aminoácidos inactivan estos microorganismos. De todas maneras, parece ser que existen también excepciones en este caso, y así Linbimov (63) describe ciertas estirpes de *Azotobacter* que poseen arginasa y ureasa.

La oxidación de los compuestos orgánicos suele ser completa y, por lo general, no producen ácidos libres. Los productos intermedios, según Harris (43), parecen ser: glucosa, gluconato, lactato, piruvato y acetato. El manitol utiliza el camino de la fructosa.

Las fuentes de nitrógeno, aparte del nitrógeno libre de la atmósfera, suelen ser los compuestos inorgánicos sencillos, especialmente el amoníaco, los nitritos; también puede utilizar urea y ciertos aminoácidos, como la adenina, asparagina, ácido glutámico, ácido aspártico y, en menor proporción, la alantoína, el uracilo y la citosina. El amoníaco tiene una marcada acción inhibitoria sobre la fijación del nitrógeno y se considera como el primer producto de la fijación. Se supone que reacciona con el ácido glutárico, para dar el ácido glutámico, como primer aminoácido primario.

Mozén (80) encuentra que el óxido nitroso inhibe la fijación del nitrógeno molecular para el *Azotobacter vinelandii*, mas no la utilización del amoníaco.

La fijación del nitrógeno atmosférico es una propiedad que poseen casi todas las variedades de todas las especies, aunque con una intensidad variable, pero existen algunos mutantes que no poseen tal propiedad. Wyss (118) obtiene por cultivo sobre gas hidrógeno mutantes que no son capaces de realizar las demás reacciones enzimáticas y poseen las demás características del género. Green (42) encuentra mutantes igualmente incapaces de fijar el nitrógeno. La cantidad de nitrógeno fijada por una cierta cantidad de sustancia carbonada consumida suele variar con las estirpes, medio de cultivo, presión de oxígeno, etc. Se suele tomar como término de comparación la glucosa consumida y oscila de 8 a 15 mg. de nitrógeno fijado /g. de glucosa consumida. Winogradsky (117), Burk (13), Parker (81 y 82), por ejemplo, han demostrado en sus investigaciones que el *Azotobacter* es capaz de fijar el nitrógeno, incluso con poca tensión de oxígeno. Del efecto de la composición del medio sobre la fijación influyen: la fuente de carbono empleada, las sales minerales y especialmente ciertos cationes, como el molibdeno y el vanadio. El vanadio se puede sustituir por el molibdeno. Son elementos imprescindibles para la fijación y el crecimiento, el magnesio, calcio, fósforo y azufre. El azufre parece ser que no le utiliza nada más que en forma de sulfato. El

hierro, en forma coloidal, o sea, el hidróxido férrico, ejerce un efecto beneficioso sobre el crecimiento y fijación del nitrógeno, y también se ha demostrado que ejercen este efecto beneficioso otras muchas sustancias coloidales, como el humus, agar-agar en poca concentración, extractos de plantas, etc. La utilización del nitrato es semejante a la de las bacterias desnitrificantes, los hongos y plantas superiores.

Ciertos cambios meteorológicos ejercen determinada influencia sobre la fijación del nitrógeno. La presión atmosférica ejerce su influencia sobre la presión parcial del nitrógeno y del oxígeno que se encuentran en contacto con la bacteria y, por consiguiente, influyen en la fijación. La mayor o menor sequedad del ambiente influye también sobre el estado y forma de encontrarse el *Azotobacter* en el suelo.

Durante la fijación se ha demostrado que elimina ciertas sustancias nitrogenadas, como el amoníaco. Winogradsky ha comprobado que la fijación del nitrógeno sigue un curso paralelo a la proliferación celular, hasta tal punto que se puede medir una de ellas y calcular la otra.

Producen infinidad de polisacáridos, fácilmente hidrolizables, y en cuyos hidrolizados pueden demostrarse la glucosa y los ácidos glucurónicos. Producen también estas bacterias, en algunos casos, pigmentos: el *Azotobacter chroococcum* produce un pigmento de color negro o pardo del tipo de las melaninas; la composición exacta no es conocida; es muy notable que éste se produce en la presencia de la luz y pequeñísimas cantidades de cobre. Topley (112) opina que para la producción del pigmento se necesita la presencia del oxígeno. Además, existen otros pigmentos azul-verdosos, fluorescentes y amarillos, los cuales se encuentran en mayor o menor proporción en muchas cepas. Johnstone (48 y 49) describe unas especies que producen un pigmento especial fluorescente, las cuales tienen una cierta habilidad especial para la síntesis de ciertos aminoácidos; en el último de los trabajos opina que los pigmentos se pueden aplicar para la clasificación de las especies, como ya comentamos en otro lugar.

Los *Azotobacter* son capaces de producir auxinas, que pueden estimular o inhibir el crecimiento de raíces y coleoptilos, y que es posible que tengan trascendencia en el desarrollo de las raíces de las plantas.

(*Concluirá*)

BIBLIOGRAFIA

RECENT PROGRESS IN MICROBIOLOGY. 1959. Almqvist and Wiksell, Estocolmo. 453 páginas.

Con el título citado se recogen los seis simposios que, patrocinados por la Asociación Internacional de las Sociedades de Microbiología y la Sociedad de Microbiología Sueca, formaron parte destacada del VII Congreso Internacional de Microbiología celebrado en Estocolmo, en 1958.

Abre el libro un prólogo del Dr. Tunevall, Director de la publicación, seguido de los discursos pronunciados por los Profs. Gard. y Mudd, —Presidentes del Congreso y de la A. I. S. M., respectivamente— en el banquete celebrado en el Ayuntamiento de la capital sueca. En un apéndice final, el Dr. C-G.Hedén, Secretario general de la A. I. S. M., ha recogido la estructura y funcionamiento de esta Asociación.

A continuación se exponen los comentarios que cada simposio ha sugerido a los autores de este artículo. Se insertan los autores y títulos de las comunicaciones, antes de los comentarios respectivos.

Simposio I. Los mecanismos de la recombinación en las bacterias

F. Jacob y E. L. Wollman: La relación entre el profago y el cromosoma bacteriano en las bacterias lisogénicas.

B. A. D. Stocker: La transducción por intermedio del fago.

L. L. Cavalli-Sforza: La recombinación en las bacterias.

H. Ephrussi-Taylor: El mecanismo de las transformaciones inducidas por el ácido desoxirribonucleico.

Se puede decir que, en la actualidad, los problemas de recombinación, transducción, transformación y lisogenia en las bacterias, junto con el estudio de la estructura química y multiplicación de los virus, constituyen los temas de mayor interés e importancia en Microbiología y, aun podemos decir, en Biología.

Los trabajos que componen este simposio, con abundantes datos experimentales, dan una clara idea del estado actual de estos problemas, demostrando terminantemente la sexualidad en las bacterias y las curio-

sas interacciones entre genes bacterianos, virus, y sustancias citoplasmáticas e incluso capsulares, que pueden influir en la herencia bacteriana.

Todos los trabajos de este simposio son de gran interés y están documentados extensamente con numerosas referencias.

Simposio II. El papel de la proteína en la síntesis del ácido nucleico y el papel del ácido nucleico en la síntesis proteínica

S. Spiegelman: La síntesis de la proteína y del ácido nucleico en las fracciones subcelulares de las células bacterianas.

E. F. Gale: Los factores de la incorporación, la incorporación de los aminoácidos y la síntesis de los ácidos nucleicos.

S. Ochoa: La biosíntesis del ácido ribonucleico.

S. Zamenhof: Estudios sobre la correlación entre el cambio en la estructura y el cambio en la función de los ácidos desoxirribonucleicos.

En los últimos tiempos, muchos bioquímicos han encontrado en la Microbiología un campo apropiado para sus trabajos, ampliándose de esta manera, también, las perspectivas y competencia de esta ciencia. Así, este simposio —lo mismo que el primero— es claramente bioquímico en cuanto a la Genética, por los temas que abarca y procedencia de sus componentes, aunque han sido realmente bacterias los substratos empleados en todos estos trabajos.

Descuella, entre las comunicaciones de este simposio, la presentada por nuestro compatriota Ochoa, resumen de su labor sobre la síntesis del ácido ribonucleico (anunciada en 1955) y que le ha valido en este último año el premio Nobel en compañía de Kornberg (éste por la síntesis del ADN). La síntesis llevada a cabo por Ochoa se realizó con una enzima, polinucleótidofosforilasa, a partir de nucleósidos-5-difosfatos, produciéndose polirribonucleótidos por la unión de mononucleótidos a través de ésteres-3-fosforibosa. La enzima empleada por Ochoa ha sido aislada a partir del *Azotobacter vinelandii*, pero su distribución no está restringida a esta bacteria, sino que se presenta de un modo general.

Ultimmente, los trabajos de Ochoa están encaminados a esclarecer el mecanismo de esta síntesis y el efecto de adición de oligonucleótidos o pequeños polirribonucleótidos, en la reacción con enzima purificada, los cuales parecen actuar como un modelo previo; con ellos se formaría un núcleo y, por adición, una cadena de mononucleótidos; tal modelo de sín-

tesis apoyaría la teoría llamada del "Guía", postulada para estos polímeros.

Los trabajos de Spiegelman y Gale están dedicados principalmente a la incorporación de aminoácidos en fragmentos bacterianos (obtenidos a partir de protoplastos, por el primero, y de células rotas, por el segundo) y que nos proporcionan información en el mecanismo de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.

La comunicación de Zamenhof está dedicada a los cambios que se pueden realizar mediante diferentes agentes en el ADN (principalmente, sustitución de timina por bromouracilo) y las posibles consecuencias en la modificación de los caracteres hereditarios.

Simposio III. Los anticuerpos específicos de los tejidos

R. R. A. Coombs: La reacción de los anticuerpos específicos de los tejidos con sus correspondientes antígenos.

Ö. Ouchterlony: Los métodos de difusión en gel para el análisis de los sistemas inmunes precipitantes de gran complejidad.

P. Grabar: La autoantigenicidad.

L. Brent y *P. B. Medawar*: La tolerancia y los fenómenos de autoinmunidad.

Los anticuerpos específicos de tejidos, primeramente demostrados por Witebsky, principalmente sobre tiroides, constituyen un tipo de anticuerpos diferentes a los clásicos o heteroanticuerpos, que se pueden didivir en isoanticuerpos y autoanticuerpos. Estos últimos encajarían dentro del anticuerpo que Ehrlich no creía posible con su concepto del *horror autotóxicus*. Sin embargo, actualmente, los estudios de transfusiones de sangre e injertos de tejidos han demostrado la existencia de grupos y aún de antigenos individuales específicos.

Las dos primeras comunicaciones están dedicadas al estudio de técnicas. Entre éstas podemos señalar modificaciones de las técnicas clásicas de fijación del complemento, de precipitación, etc., y las nuevas técnicas de difusión en gel de agar, incluso con ayuda de electroforesis.

Las otras dos comunicaciones estudian ampliamente el concepto de autoanticuerpos, a que nos hemos referido, y de tolerancia como un medio de defensa natural contra el peligro de que células formando anticuerpos puedan reaccionar sobre constituyentes del cuerpo del cual forman parte.

Simposio IV. Las infecciones enmascaradas y latentes producidas por los virus

A. Lwoff: La latencia al nivel celular y el problema tripartito.

C. W. Bennett: Las infecciones enmascaradas debidas a los virus de plantas.

K. Maramorosch: Las infecciones latentes producidas por los virus en los artrópodos.

R. E. Shope: Las infecciones latentes producidas por los virus en los animales.

En este simposio se trata de un problema general que se presenta en las infecciones producidas por virus, sean éstos de la clase que sean.

En el primer trabajo, Lwoff se refiere a los problemas de latencia, en general, con ejemplos de bacteriófagos, lisogenia, virus de plantas y animales e incluso del cáncer. Tanto Lwoff como los demás autores, ya en sus estudios especializados, tratan, sobre todo, de la influencia de los factores externos (temperatura, radiaciones ultravioleta y X, condiciones o tipo del huésped e incluso el paso del virus a través de parásitos vectores) sobre la producción del estado de infección latente y su vuelta al estado de infección aparente. Es de sentir que, en casi todos los trabajos, se trate el problema como interacción entre factores externos, organismos y virus, sin dar la debida importancia a la relación célula-virus, que es donde creemos se puede encontrar la clave que pueda explicar debidamente los fenómenos de latencia.

De todos estos trabajos, es de destacar el de Maramorosch sobre virus deartrópodos, pues es en ellos donde estos fenómenos se presentan con mayor constancia y características más interesantes, si exceptuamos el fenómeno de lisogenia en el bacteriófago. La discusión de este trabajo, en la que toman parte gran número de especialistas, es también de gran interés.

Simposio V. Los animales libres de gérmenes

J. A. Reyniers: El Programa sobre los animales libres de gérmenes del Instituto Lobund de la Universidad de "Notre Dame": recapitulación del período 1928-1958.

P. György: Observaciones sobre los animales libres de gérmenes en el Instituto "Walter Reed", de investigación, del Ejército, de Wáshington (EE. UU.).

M. Miyakawa: Informe sobre las investigaciones en animales libres de gérmenes llevadas a acabo en el Departamento de Patología de la Universidad de Nagoya (Japón) y observaciones sobre cicatrización de heridas, trasplante e inflamación producida por cuerpos extraños en cobayos libres de gérmenes.

W. H. Wright, B. P. Phillips y *W. L. Newton*: Investigaciones sobre animales libres de gérmenes en los Institutos Nacionales de Sanidad.

B. Gustafsson: Investigaciones sobre los animales libres de gérmenes en el Instituto de Histología de la Universidad de Lund.

H. A. Gordon y *B. S. Wostmann*: Respuestas del animal-huésped a los cambios en el medio ambiente bacteriano: transición de la rata albina del estado libre de gérmenes al estado de contaminación corriente.

T. D. Luckey: Modos de acción de los antibióticos en la estimulación del crecimiento.

T. G. Ward: Las virosis en los animales libres de gérmenes.

La cuestión, que ya en 1885 propuso Pasteur, de si la presencia de gérmenes no patógenos en los organismos es perjudicial, beneficiosa o hasta indispensable, parece ser que ahora puede ser elucidada con las nuevas técnicas que permiten la cría durante varias generaciones de animales superiores libres de gérmenes. Desde entonces hasta el presente se han realizado diversos intentos de conseguir la cría de animales de laboratorio libres de gérmenes, no habiéndose conseguido hasta hace poco tiempo. Las dificultades han residido, principalmente, en idear y fabricar los aparatos y técnicas necesarios para tal fin, dando idea de esta dificultad el que en los EE. UU., habiendo empezado hace treinta años un plan de investigación en este sentido, hayan empezado a obtener buenos resultados hace unos seis años, nada más. Actualmente, todavía existen algunas dificultades en conseguir que los alimentos, una vez esterilizados, posean los factores necesarios para el normal desarrollo de los animales, ya que se ha encontrado que al esterilizar por el calor ciertos alimentos los animales no pueden reproducirse, se vuelven estériles.

Si es importante el estudio de los animales libres de gérmenes en sí mismos: su anatomía, bioquímica, nutrición, fisiología y serología, aún lo es más si los consideramos como campos de ensayo ideales para estudiar la infección, la virulencia, los factores coadyuvantes que podemos modificar a nuestro gusto, infecciones mixtas, influencia de microorganismos no patógenos, etc. Esta importancia ha sido reconocida por la U.N.E.S.C.O. en su último plan trianual, recomendando el estudio y difusión de las investigaciones sobre animales asépticos.

En este simposio la mayoría de los trabajos tratan de la descripción de instalaciones y aparatos, técnicas, razas de animales y organización técnica de los laboratorios. Solamente en dos trabajos se trata de in-

vestigaciones sobre la conducta biológica de los animales estériles frente a microorganismos y sus reacciones antigénicas ante materiales inertes, como, por ejemplo, agar, con lo que se ha demostrado la casi nula formación de defensa (fagocitosis, principalmente), ante las materias extrañas, de los animales asépticos comparados con los normales.

En un futuro próximo es de esperar que, una vez resueltos los problemas técnicos de cría y manejo de animales asépticos, todos o la mayoría de los trabajos en un simposio sobre este tema estarían dedicados a las investigaciones sobre la conducta biológica de estos animales.

Simposio VI. Los métodos de cultivo continuo y su aplicación

V. Bryson: Aplicación del cultivo continuo a la selección microbiana.
D. Herbert: Principios del cultivo continuo.
M. J. Johnson: La aportación de oxígeno en el cultivo continuo.
A. Novick: Experimentación con el quimiostato.

En estos últimos años, la invención de los aparatos quimiostato y turbidostato para el cultivo automático continuo de microorganismos, el primero basado en conservar el crecimiento a un nivel constante por medio de un factor limitante que se va añadiendo a velocidad dada, y el segundo añadiendo medio de cultivo automáticamente al aumentar la turbidez del cultivo, ha creado una nueva técnica microbiológica que puede tener gran repercusión, tanto en el campo de la investigación pura como en el industrial.

En este simposio se han presentado 4 trabajos fundamentales que abarcan desde la teoría matemática del cultivo continuo, el diseño de aparatos y la aplicación de estas técnicas hasta la solución de problemas tales como la selección de estirpes, consumo de oxígeno por un cultivo, evolución de cultivos y cinética de la inducción enzimática. En la discusión también se han expuesto algunas experiencias de aplicación a la industria de la fermentación y la posible aplicación de esta técnica al cultivo continuo de células de mamífero, con lo cual se podría obtener como derivado de un cultivo continuo de virus. En general, la parte de la que se ha tratado más es la de los principios matemáticos de esta técnica. Se echa en falta en este simposio la poca o, mejor dicho, casi nula información sobre los factores de contaminación, que, en la práctica, sabemos que son muchos y uno de los mayores problemas de esta técnica.

M. Rubio-Huertos y *R. Moreno*

EDGARD H. RELYVELD: *Toxine et antitoxine diphtériques. Étude immunologique.* 1959. Actualités scientifiques et industrialles, 1278. Hermann, París. 164 páginas.

El autor recoge en el presente libro los resultados de los trabajos efectuados en el nstituto Pasteur bajo la dirección del Prof. Raynaud. Además, de la parte básica, formado por siete capítulos, consta de una introducción, resumen y discusión general, abreviaciones y unidades, y bibliografía. Los títulos de dichos capítulos, cada uno de los cuales se inicia con un resumen histórico del tema tratado, son los siguientes:

I. Plan del trabajo.—II. Preparación de la toxina diftérica.—III. Purificación de la toxina diftérica.—IV. Análisis inmunológicos mediante técnicas de difusión en gelosa.—V. Hiperinmunización de los caballos con la anatoxina diftérica purificada.—VI. Estudio cuantitativo de la reacción toxina-antitoxina diftéricas.—VII. Estudio acerca de los grupos específicos en la antigenicidad de la toxina diftérica y sus anticuerpos correspondientes.

Las características de esta bien pensada obra hacen que su utilidad se extienda a cualquier otro estudio de proteínas y de sus anticuerpos específicos.

PRIMER CONGRESO INTERNACIONAL DE HISTOQUIMICA Y DE CITOQUIMICA

Este Congreso se celebrará en París, del 28 de agosto al 3 de septiembre del año actual, bajo la presidencia del Prof. Verne. El programa provisional comprende tres secciones: Problemas físicos (Presidendente: Prof. Voss); Factores bioquímicos aplicados a la Histoquímica (Presidente: Prof. Lillie); Histoquímica aplicada (Presidente: Prof. Seki).

Para toda clase de información, las personas interesadas pueden dirigirse al Secretario General del Congreso, Dr. R. Wegmann. Institut d'Histochimie Médicale, 45, rue des Saint-Peres. París (6) (Francia).

Depósito legal, M. 702. 1958

Artes Gráf. REYES - Jerónima Llorente, 15 - Madrid

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
JOAQUIN COSTA, 32 - MADRID, 6 (ESPAÑA)

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

Suscripción (4 números): España, 110 pta.; extranjero, 150 pta.
Número: España, 30 pta.; extranjero, 40 pta.

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA» DEL C. S. I. C.

ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA (publicada por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal. Madrid). Mensual. Suscripción: España, 160 pta.; extranjero, 240 pta. Número: España, 20 pta.; extranjero, 30 pta.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE "AULA DEI" (Estación Experimental de "Aula Dei". Zaragoza). Irregular. Suscripción: España, 120 pta.; extranjero, 160 pta. Número: España, 40 pta.; extranjero, 50 pta.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO "A. J. CAVANILLES" [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto "A. J. de Cavanilles". Madrid). Anual. Suscripción: España, 190 pta.; extranjero, 220 pta. Número: España, 200 pta.; extranjero, 230 pta.

ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España: 150 pta.; extranjero, 175 pta. Número: España, 160 pta.; extranjero, 185 pta.

ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 80 pta.; extranjero, 100 pta. Número: España, 45 pta.; extranjero, 60 pta.

ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 165 pta. Número: España, 30 pta.; extranjero, 60 pta.

CEDRO (Instituto de Estudios de Jardinería y Arte Paisajista. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 160 pta. Número: España, 30 pta.; extranjero, 45 pta.

COLLECTANEA BOTANICA (Instituto Botánico Municipal. Barcelona). Anual. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 125 pta. Número: España, 110 pta.; extranjero, 135 pta.

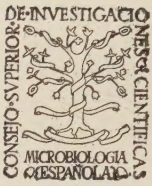
CURSILLOS Y CONFERENCIAS DEL INSTITUTO "LUCAS MALLADA" (Instituto "Lucas Mallada", de Investigaciones Geológicas. Madrid). Anual. Suscripción: España, 50 pta.; extranjero, 80 pta. Número: España, 60 pta.; extranjero, 70 pta.

ESTUDIOS GEOLOGICOS (Instituto "Lucas Mallada", de Investigaciones Geológicas. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 150 pta.; extranjero, 200 pta. Número: España, 40 pta.; extranjero, 60 pta.

FARMACOGNOSIA (Instituto "José Celestino Mutis", de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 80 pta.; extranjero, 120 pta. Número: España, 25 pta.; extranjero, 40 pta.

GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto "José Celestino Mutis", de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 70 pta.; extranjero, 110 pta. Número: España, 20 pta.; extranjero, 30 pta.

PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 150 pta. Número: España, 40 pta.; extranjero, 60 pta.


CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA